

**GENOMWEITE KARTIERUNG VON QTL
MIT ASSOZIATION ZUR RESISTENZ/EMPFINDLICHKEIT
GEGENÜBER SARCOCYSTIS MIESCHERIANA
BEIM SCHWEIN**

THOMAS BERGE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**Genomweite Kartierung von QTL mit Assoziation zur
Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *Sarcocystis miescheriana*
beim Schwein**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

THOMAS BERGE
Tierarzt aus Bad Hersfeld

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner
Prof. Dr. C. G. Greveling

Tag der Disputation: 24.06.2008

MEINER FAMILIE

Teile dieser Dissertation wurden bereits vorab publiziert:

Reiner, G., Kliemt, D., Willems, H., Berge, T., Fischer, R., Köhler, F., Hepp, S., Hertrampf, B., Dauschies, A., Geldermann, H., Mackenstedt, U., Zahner, H.,
2007: Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. *Genomics* 89, 638-664.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Krankheitsresistenz	3
2.1.1 Bedeutung der Krankheitsresistenz für die Praxis	3
2.1.2 Wege zur Nutzung von Krankheitsresistenzen in der Tierzucht.....	3
2.1.3 Beispiele für natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren	6
2.1.4 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein	7
2.2 Genomanalyse	10
2.2.1 Was ist Genomanalyse?	10
2.2.2 Genomanalyse und Kandidatengene	11
2.2.3 Positionelle und funktionelle Genomanalyse	11
2.2.4 Genomkartierung.....	13
2.3 <i>Sarcocystis miescheriana</i>	29
2.3.1 Kokzidien im Überblick	29
2.3.2 <i>Sarcocystis miescheriana</i>	30
2.3.3 Epidemiologie	31
2.3.4 Entwicklung und Pathogenese	32
2.3.5 Interaktionen zwischen Erreger und Wirt	34
2.3.6 Klinik der Sarkozystose	35
2.3.7 Pathologie.....	36
2.3.8 Therapie und Prophylaxe	39
2.3.9 Hinweise auf genetisch bedingte Resistenzunterschiede	40
3. Material und Methoden	41
3.1 Versuchstiere / Erzeugung und Behandlung der Tiere.....	42
3.1.1 Erzeugung infomativer F ₂ -Familien.....	42
3.1.2 Haltung der F ₂ -Kreuzungstiere und Probengewinnung	43
3.2 Geräte und Labormaterial.....	45
3.2.1 Spezialgeräte	45
3.2.2 Cemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	46
3.2.3 Lösungen und Puffer	47
3.3 Bearbeitung des Probenmaterials	48
3.3.1 DNA-Isolierung.....	48
3.3.2 DNA-Messung und Qualitätsprüfung	49
3.4 Auswahl der Mikrosatellitenloci und Primer	50
3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	56
3.6 Fragmentlängenanalyse	58
3.6.1 Längenstandard	58
3.6.2 Herstellung der Gele.....	60
3.6.3 Probenvorbereitung und –auftragung	60
3.6.4 Elektrophoresebedingungen	60

3.6.5	Auswertung der Fragmentlängenanalyse	61
3.7	Statistische Auswertung	64
3.7.1	Kopplungsanalyse	64
3.7.2	QTL-Kartierung	64
4.	Ergebnisse	65
4.1	Phänotyp.....	65
4.2	Genotypen	65
4.2.1	Analyse der Mikrosatellitenloci	65
4.2.2	Kopplungskarten der Chromosomen.....	68
4.3	QTL-Kartierung	74
4.3.1	Übersicht	74
4.3.2	QTL klinischer Merkmale.....	77
4.3.3	QTL klinisch-chemischer Merkmale	79
4.3.4	QTL hämatologischer Merkmale	81
4.3.5	QTL parasitologischer Merkmale	83
4.3.6	QTL immunologischer Merkmale.....	86
5.	Diskussion.....	90
5.1	Klinische Merkmale (Rektaltemperatur und Herzfrequenz)	90
5.2	Klinisch-chemische Merkmale.....	91
5.3	Hämatologie	92
5.4	Bradyzoitenzahl im Muskelgewebe	93
5.5	Immunglobuline	94
5.6	Fazit.....	95
6.	Zusammenfassung	97
6.	Summary	100
7.	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

<i>a</i>	additiver Geneffekt
Abb.	Abbildung
mA	Milliampere
AP	alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CK	Kreatinkinase
<i>d</i>	Dominanzeffekt
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc	et cetera; und weitere (dt.)
<i>F</i>	F-Wert
F ₁	1. Filialgeneration
F ₂	2. Filialgeneration
h ²	Heritabilität
Ig	Immunglobulin
Lod	Logarithm of the odds
ME	Chinesisches Meishan
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute
MHC	Major Histocompatibility Complex
M.l.d.	Musculus longissimus dorsi
<i>p</i>	Signifikanzniveau
PCR	Polymerase chain reaction
p.i.	post infectionem
PI	Europäisches Pietrain
QTL	quantitative trait loci
rpm	revolutions per minute

s	Sekunde
SD	Standardabweichung
S.m.	Sarcocystis miescheriana
sog.	sogenannt(e)
SSC	Sus scrofa chromosome
Sw...	Mikrosatellitennomenklatur in USDA-list
Tab.	Tabelle
Taq	Termophilus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USDA	amerikanisches Genomkartierungsprogramm
usw.	und so weiter
V	Volt
v.a.	vor allem
W	Watt
www	world wide web
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Physikalische und genetische Karte im Vergleich	S. 15
Abbildung 2:	Schema zur Erstellung einer F ₂ - und einer Rückkreuzungsgeneration	S. 20
Abbildung 3:	Vergleichende Kartierung von Mensch, Maus und Schwein (SSC6)	S. 25
Abbildung 4:	Vergleichende Kartierung von Mensch und Schwein (SSC6)	S. 26
Abbildung 5:	Möglicher Ansatz zur Kartierung von Krankheitsresistenzloci (Übersicht)	S. 28
Abbildung 6:	Entwicklungszyklus von <i>S. miescheriana</i> (schematisch, nach ROMMEL et al., 1979)	S. 32
Abbildung 7:	Übersicht des Versuchsablaufes	S. 41
Abbildung 8:	Darstellung eines Gelbildes mit der 1DScanEx-Software; M: Längenstandard; rechts: Größe der Längenstandardamplifikate in Basenparen (bp)	S. 62
Abbildung 9:	1DScanEx-Darstellung des Längenstandards (1=71bp; 2=141bp; 3=180bp; 4=225bp; 5=281bp)	S. 63
Abbildung 10:	1DScanEx-Auswertung einer Multiplex-PCR mit 3 verschiedenen Primerpaaren (Sw803, Sw349, Sw2443)	S. 63
Abbildung 11:	Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): links: Markernamen; rechts: Abstände der Marker in cM; unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM	S. 69
Abbildung 12:	QTL klinischer Merkmale (HF: Herzfrequenz; RT: Rektaltemperatur)	S. 78
Abbildung 13:	QTL klinisch-chemischer Merkmale	S. 80
Abbildung 14:	Zusammenhang zwischen der Anzahl eosinophiler Granulozyten (Tag 28 p.i.) und Genotyp am Marker S0296 (Allele: P = Pietrain; M = Meishan)	S. 81
Abbildung 15:	QTL hämatologischer Merkmale (Eos.: Eosinophile; Thro.: Thrombozyten)	S. 82

Abbildung 16:	Auf SSC7 konnten zwei ausgeprägte QTL für die Bradyzoitenzahl im M.l.d. ($F=17,39$) im Bereich des Markers LTA sowie für die IgG ₂ -Spiegel (Tag 42 p.i.) ($F=20,92$) im Bereich des Markers Sw764 kartiert werden.	S. 83
Abbildung 17:	QTL für die Anzahl Bradyzoiten im M.l.d. (Brad. M.l.d.) bzw. in der Herzmuskulatur (Brad. H.).	S. 84
Abbildung 18:	Zusammenhang zwischen Bradyzoitenzahl und Allelform am Marker LTA	S. 85
Abbildung 19:	QTL immunologischer Merkmale	S. 87
Abbildung 20:	Assoziation zwischen Pietrainallel und hohen IgG ₂ -Titern an Tag 28 p.i. am Marker Sw1608	S. 88
Abbildung 21:	Assoziation zwischen Meishanallel und hohen IgG ₂ -Titern an Tag 42 p.i. am Marker Sw764	S. 88
Abbildung 22:	Assoziation zwischen Pietrainallel und hohen IgG ₂ -Titern an Tag 42 p.i. am Marker Sw2431	S. 89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erstellung der F ₁ -Generation	S. 42
Tabelle 2:	Kreuzungsschema der F ₁ -Generation zur Erstellung der F ₂ -Generation und Anzahl der F ₂ -Tiere	S. 43
Tabelle 3:	Aufbau und Umfang der F ₂ -Familie	S. 43
Tabelle 4:	Liste der Mikrosatelliten und deren Primersequenzen und Informationen über Chromosomennummer, Annealingtemperatur, Verdünnungsstufe des Amplifikats zur Verwendung im Sequenzierautomaten und über die PCR-Bedingungen	S. 50
Tabelle 5:	PCR-Reaktionsansatz (Hot Start Polymerase, Eppendorf)	S. 57
Tabelle 6:	Multiplex-PCR-Reaktionsansatz (Qiagen Multiplex PCR-Kit)	S. 57
Tabelle 7:	Programm: PCR Eppendorf-Hot-Start-Polymerase	S. 57
Tabelle 8:	Programm: Multiplex-PCR	S. 58
Tabelle 9:	Namen und Sequenzen der zur Längenstandardherstellung genutzten Primer	S. 59
Tabelle 10:	Multiplex-PCR-Ansatz zur Herstellung des Längenstandards	S. 59
Tabelle 11:	Programm: Längenstandard-PCR	S. 59
Tabelle 12:	Pre-Run-Bedingungen (Sequenzierautomat)	S. 61
Tabelle 13:	Run-Bedingungen (Sequenzierautomat)	S. 61
Tabelle 14:	Marker, sortiert nach Chromosomen (SSC: <i>Sus scrofa</i> Chromosom) und Position (cM). Allele der Founderrassen (PI: Pietrain, ME: Meishan)	S. 65
Tabelle 15:	QTL sortiert nach Chromosom und F-Wert	S. 74

1. Einleitung

Die Weiterentwicklung molekulargenetischer Genomanalyseverfahren ermöglicht heute die Identifikation von Genen mit Effekten auf Gesundheit und Leistung von Nutztieren. Die Züchtung von Tierpopulationen mit verminderter Krankheitsanfälligkeit stellt international eine große Herausforderung dar.

Zum einen verlangt die Urproduktion möglichst hohe Rentabilitäten und zum anderen erwünscht der Endverbraucher sichere Lebensmittel aus einer Produktion mit minimalem Medikamenteneinsatz, frei von Zoonoseerregern und Rückständen.

Zystenbildende Kokzidien der Gattung *Sarcocystis* sind weltweit vorkommende Parasiten der Nutztiere und daher von ökonomischem Interesse. Bei *Sarcocystis miescheriana* (*S. miescheriana*) handelt es sich um einen einzelligen Parasiten, der beim Zwischenwirt Schwein ein akutes und chronisches Krankheitsbild verursacht. Beim Schwein wurden bereits signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber *S. miescheriana* zwischen den Rassen Meishan und Pietrain festgestellt. Die Rasse Pietrain erwies sich dabei als signifikant empfindlicher als Meishan.

Die erhebliche Variabilität der Phänotypen unter der Infektion ist zu einem bedeutenden Anteil genetisch fixiert.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der für die Variabilität verantwortlichen Genorte. Ein vielversprechender Ansatz zur Identifikation solcher Genorte und deren Varianten ist die Berechnung von QTL (Quantitative Trait Loci). QTL sind individuelle Genorte, die einen Beitrag zur Variation quantitativ verteilter Merkmale leisten.

Mit Hilfe der QTL-Analyse wurden in den letzten Jahren sehr erfolgreich Chromosomenregionen mit Bedeutung für ökonomisch relevante Merkmale erarbeitet. In informativen Familien werden hierzu Marker- und Kandidatengenloci genutzt, um Genorte für die untersuchten Merkmalsausprägungen zu kartieren.

Für die QTL-Kartierung werden DNA-Polymorphismen mit bekannter Position auf den Chromosomen (DNA-Marker) genutzt. Die meisten DNA-Marker haben eine unbekannte Funktion. Da aber die DNA-Marker gemeinsam mit den Genen in ihrer Nachbarschaft an die Nachkommen weitervererbt werden, lässt sich der Erbgang aller Gene in der Nachbarschaft der Marker verfolgen. In informativen Familien dienen segregierende Markerallele dazu, mittels QTL-Analyse Assoziationen zwischen chromosomalen Regionen und phänotypischer Variabilität festzustellen.

Für die Tierarten Schwein, Rind und Geflügel wurden schon mehrere hundert QTL erarbeitet, wobei die meisten QTL für Leistungsmerkmale, wie z.B. Fleischbeschaffenheit, Schlachtkörperzusammensetzung und Mastleistung kartiert wurden. Für Merkmale der Krankheitsresistenz sind bei allen Tierarten noch sehr wenige QTL erforscht.

Beim Schwein sind bislang etwa 15 krankheitsresistenzassoziierte QTL bekannt; keiner davon steht im Zusammenhang mit parasitären Erregern.

Mit der vorliegenden Untersuchung sollen QTL mit Auswirkungen auf die Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *S. miescheriana* kartiert werden, um die Basis für ein verbessertes Verständnis molekularer Abwehr- und Pathogenesemechanismen sowie für Screening und Selektion resistenterer Schweine zu legen.

2. Literaturübersicht

2.1 Krankheitsresistenz

2.1.1 Bedeutung der Krankheitsresistenz für die Praxis

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Bedeutung von Tier- und Verbraucherschutz stellt die Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz bzw. der erhöhten Widerstandskraft gegenüber Infektionserregern eine Ergänzung der klassischen Maßnahmen zur Gesunderhaltung der Nutztierbestände dar. Die Verwendung absolut oder relativ resistenter Nutztier-/Schweinepopulationen führt zu einer verbesserten Gesundheitssituation in den Beständen. Durch die geringere Erregerausscheidung wird der Infektionsdruck gesenkt. Daraus würden sich eine Steigerung der Tierleistung, eine Verringerung des prophylaktischen und therapeutischen Medikamenteneinsatzes und eine Verbesserung des Tierschutzes ergeben. Nach PLONAIT und BICKARDT (1997) ist in Zukunft eine Situation vorstellbar, in der Schweine durch optimale Haltung und Prophylaxe nahezu krankheitsfrei gehalten werden könnten. Ein weiterer Aspekt ist die zunehmende Resistenzentwicklung von Erregern gegenüber Antibiotika bzw. Antiparasitika. Beispielsweise ist in bestimmten Regionen Australiens und Südafrikas Schafproduktion ohne Nutzung der genetischen Resistenz einzelner Rassen gegen Magen-Darm-Nematoden vor dem Hintergrund massiver Resistenzen der Parasiten gegen Antiparasitika heute kaum mehr möglich (STEAR & WAKELIN 1998).

2.1.2 Wege zur Nutzung von Krankheitsresistenzen in der Tierzucht

Unter Krankheitsresistenz versteht man die Summe aller Faktoren die zur reduzierten Empfindlichkeit eines Tieres, einer Population oder einer Rasse gegenüber bestimmten Erregern beiträgt, sodass sich nach Erregerkontakt keine oder reduzierte klinische Anzeichen der entsprechenden Infektionskrankheit zeigen. Resistenz bedeutet im eigentlichen Sinne, dass neben dem Ausbleiben klinischer Symptome möglichst keine Infektion stattfinden kann, der Wirt also absolut unempfindlich für bestimmte Erreger ist. Von der Resistenz

abzugrenzen ist die Toleranz, bei der der Wirt zwar infiziert, der Erreger jedoch toleriert wird und nur geringe Krankheitsanzeichen vorkommen. Im Allgemeinen aber werden Resistenz und Toleranz unter dem Begriff Krankheitsresistenz zusammengefasst, wobei zwischen absoluter und relativer Resistenz unterschieden wird.

Krankheitsresistenz wird nicht allein durch genetische Faktoren bestimmt, sondern auch durch die zum Zeitpunkt der Infektion vorherrschende Kondition der Tiere. Konditionelle Schwankungen ergeben sich durch Faktoren wie Immunitätslage, Alter, Hygiene- und Haltungsbedingungen, Trächtigkeit, Laktation, Ernährungszustand und Stress.

Die Heritabilität (h^2) für Merkmale der Krankheitsresistenz ist relativ niedrig ($h^2 = 0,01-0,15$) (GAILLARD, 1997). Deshalb versprechen konventionelle Zuchtprogramme trotz aufwendiger Nachkommenprüfungen kaum Erfolg. Detailliertere Ausführungen zur Erbllichkeit der Krankheitsresistenz finden sich bei HEPP (2006). Merkmale der Krankheitsresistenz werden meist polygen vererbt, es sind aber auch Hauptgenwirkungen bekannt. Auch muss z.B. die ausgeprägte Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen nicht zwangsläufig zu einer effizienten Antwort gegenüber einem anderen Antigen führen (BENACERRAF & McDEVITT, 1972; GAVORA & SPENCER, 1978, 1983; MALLARD et al. 1992, 1998; WILKIE et al. 1998). Auch die unerwünschte Kopplung zwischen Resistenz- und anderen Genen kann in bestimmten Fällen die Selektion verkomplizieren, wenn antagonistische Effekte in Bezug auf Produktionsdaten und Krankheitsresistenz auftreten (GAVARO & SPENCER, 1978, 1983; EDFORS-LILJA et al., 1986; MEEKER et al., 1987). Liegt das gewünschte Gen eng gekoppelt mit einem sich auf den Leistungsphänotyp negativ auswirkenden Gen, können unerwünschte Effekte bei den Nachkommen auftreten. Beispielsweise liegt beim Schwein auf Chromosom 6 die Resistenz gegenüber *E. coli* F18-Rezeptoren eng gekoppelt mit der stressempfindlichen Variante des MHS-Gens (VÖGELI et al., 1996).

Resistenzmechanismen beruhen auf zahlreichen Faktoren. Einerseits auf der Erregerabwehr, andererseits auf Unempfindlichkeit. Können bestimmte Infektionserreger nicht im Organismus haften, weil die entsprechenden Rezeptoren fehlen, ist dieser Organismus nicht für den Erreger empfänglich und erkrankt nicht. Es handelt sich dann meistens um eine absolute Resistenz. Für die Erregerabwehr unterscheidet MAYR (1991) zwei verschiedene Arten:

- Anatomische und physiologische unspezifische Barrieren, wie z.B. Haut, Schleimhaut, Flimmerepithel, Enzymaktivitäten, pH-Wert usw.
- Die Immunantwort mit zwei Abwehrstrategien:
 1. Unspezifische Abwehr mit Monozyten bzw. Makrophagen und humoralen Faktoren, wie Lysozym, Zytokine usw.
 2. Spezifische Abwehr mit T- und B-Lymphozyten und deren Antikörpern.

In Selektionsprogrammen auf hohe bzw. niedrige Immunantwort nach Impfungen gelang eine Steigerung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort (GAVARO & SPENCER, 1983; MALLARD et al., 1992, 1998; WILKIE et al., 1998). Die Tiere mit der stärkeren Immunantwort (high immune responders, HIR) zeigten auch höhere tägliche Zunahmen (MALLARD et al., 1998). In Kanada existiert mittlerweile ein kommerzielles Selektionsprogramm auf der Basis eines hohen Immunresponses (HIRTM) (WILKIE & MALLARD, 2000).

Für das Funktionieren der spezifischen Immunabwehr ist das Vorhandensein des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, major histocompatibility complex) von entscheidender Bedeutung. Dort werden auch wichtige Kandidatengene für die Resistenz gegenüber verschiedenen Erregern vermutet. Zwischen MHC-Haplotypen und Krankheitsresistenz sind schon mehrere Assoziationen festgestellt worden. So ist die Resistenz von bestimmten Hühnerlinien gegenüber der Marek'schen Krankheit auf spezifische Haplotypen im MHC-Komplex zurückzuführen (MÜLLER & BREM, 1991). Beim Schwein wurden solche Zusammenhänge für *Bordetella bronchiseptica* (ROTHSCHILD et al., 1984b), *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium* (LACEY et al., 1989) sowie *Trichinella spiralis* (MADDEN et al., 1993) beschrieben.

Um die Krankheitsresistenz in Zuchtprogramme einzubeziehen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Der klassische Weg wäre die Nutzung konventioneller Zuchtprogramme nach Zuchtwertschätzung auf bestimmte Krankheitsfaktoren. Grundvoraussetzung hierfür ist die

zuverlässige Erfassung und Sammlung komplexer Krankheitsdaten. Eine weitere Methode, krankheitsresistente Tiere zu züchten, ist die Auswahl der Zuchttiere in Selektionsprogrammen durch Marker-gestützte-Selektion (MAS, marker assisted selection) (LANDE & THOMPSON, 1990; HOSPITAL et al., 1992; MEUWISSEN & van ARENDONK, 1992; SOLLER, 1994, VÖGELI et al., 1997). Die Voraussetzungen für die MAS werden genauer im Kapitel Genomanalyse (Kap. 2.2) beschrieben.

Eine dritte Möglichkeit zur Erzeugung krankheitsresistenter Tierpopulationen ist theoretisch der Einsatz des Gentransfers. Hierbei könnten ausgesuchte Genvarianten, die sich günstig auf die Regulation der Krankheitsresistenz auswirken, in das Genom eingeschleust werden.

2.1.3 Beispiele für natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren

Die ersten wissenschaftlichen Studien zur Krankheitsresistenz wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt (HUTT, 1958). Die bedeutsamsten Krankheitsresistenzen bei Nutztieren sind die Resistenzen gegen Trypanosomen und Zecken beim Rind (MURRAY et al., 1991) sowie gegen Magen-Darm-Nematoden beim Schaf (BAKER et al., 1999), welche man in den betroffenen Gebieten zur Verbesserung der Produktionsbedingungen auch praktisch nutzt. Gegen die Trypanosomiasis gilt die Rinderrasse *N'Dama* als besonders resistent (ROBERTS & GRAY, 1973). Gegenüber Zecken sind die Rinder der Gattung *Bos indicus*, der Rassen *Nguni* und *Brahma* besonders resistent (SPICKETT et al., 1989; RECHAV et al., 1990). Als besonders resistent gegen Magen-Darm-Nematoden gelten die Schafrassen *Scottish Blackface* und *Red Massai* (PRESTON & ALLONBY, 1978; ABBOTT et al., 1985). Beim Geflügel wurden erstmals kommerziell die Krankheitsresistenzen gegen die Erreger der aviären Leukose und der Marek'schen Krankheit in Selektionsprogramme integriert (COLE, 1968). In Skandinavien wird mittlerweile die Mastitisresistenz beim Milchrind züchterisch genutzt (HERINGSTAD et al., 2000).

2.1.4 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein

2.1.4.1 Virale Infektionskrankheiten

MENGELING & CUTLIP beschrieben 1976 Resistenzunterschiede bei verschiedenen Schweinerassen gegenüber dem *hämagglutinierenden Enzephalomyelitisvirus* aus der Familie der Coronaviren. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte nicht aufgeklärt werden. Bei Infektionen mit dem *Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus* (PRRSV) waren Tiere der Rasse *Duroc* resistenter als andere Schweinerassen (HALBUR et al., 1998). KRISTENSEN (1995) berichtet über eine MHC-assoziierte *PRRS*-Resistenz. Gegenüber dem Virus der Afrikanischen Schweinepest gelten *Warzen-* und *Pinseloherschweine* als relativ resistent (OURA et al., 1998), weil bei ihnen eine geringere Virusreplikation in Milz und Tonsillen als bei Hausschweinerassen stattfindet. Wahrscheinlich ist die apoptosevermittelnde Zytokinfreisetzung aus infizierten Makrophagen hieran beteiligt (MARTINS et al., 1993; OURA et al., 1998). Im Zusammenhang mit Influenzavirusinfektionen spielen Mx1-Proteine eine Rolle. Das Wildtyp Mx1-Gen der Maus verleiht Resistenz gegenüber Influenzaviren durch Interferon-induzierte Blockade der Virussynthese (HALLER et al., 1998). Ein Versuch der Übertragung der resistenzauslösenden Variante des Mäuse-Mx1-Gens auf das Schwein scheiterte an der nicht einsetzenden Expression des Gens (MÜLLER et al., 1992). In Untersuchungen von ROTHSCILD et al. (1984a) zeigten nach Vakzination mit dem *Pseudorabiesvirus* (*PrV*), dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, Schweine der Rassen *Yorkshire* und *Chester White* höhere Impfantikörperspiegel als die Rassen *Hampshire*, *Duroc* und *Landrasse*. EDFORS-LILJA et al. (1998) konnten genetische Unterschiede in der Interferon- α -Produktion nach *PrV*-Infektion nachweisen. REINER et al. (2002b) gelang es QTL für die Resistenz gegenüber dem *PrV* nachzuweisen. Resistenzunterschiede hinsichtlich des *Porcinen Circovirus Typ 2* (*PCV2*) wurden von OPRIESSNIG et al. (2006) beschrieben.

2.1.4.2 Bakterielle Infektionskrankheiten

CAMERON et al. beschrieben Anfang der 1940er Jahre eine Resistenz gegenüber *Brucella suis*, und sie fanden Hinweise auf eine Hauptgenwirkung (CAMERON et al., 1940, 1942). Etwa zur gleichen Zeit gelang es, eine Schweinelinie mit absoluter Resistenz gegenüber der akuten und der chronischen Form des Rotlaufs zu entwickeln (HUTT, 1958). Auch über Resistenzen gegenüber Rhinitis atrophicans und Dysenterie wurde berichtet (HUTT, 1958). PRZYTULSKI & PORZECZKOWSKA (1980) beschrieben genetische Resistenzunterschiede nach Infektion mit Leptospiren in Zuchtversuchen. In Immunreaktivitätstests nach Vakzination mit *Bordetella bronchiseptica* konnten ROTHSCILD et al. (1984b) die festgestellten Unterschiede mit dem Vorhandensein von verschiedenen MHC-Haplotypen begründen. Tiere mit dem SLA^{a/a}-Haplotyp zeigten dabei die stärkste Immunantwort.

Das Gen NRAMP1 auf Chromosom 15 wird für eine Steigerung der Resistenz gegenüber Salmonellen-Infektionen verantwortlich gemacht (BLACKWELL, 1996; TUGGLE et al., 1997; SUN et al., 1998).

Genetisch bedingte Resistenzen gegenüber enteropathogenen *Escherichia (E.) coli* sind bekannt und deren zugrunde liegende Mechanismen wurden fast vollständig aufgeklärt. Obligater Virulenzfaktor ist das Anheften der *E. coli*-Bakterien mittels Fimbrien an den entsprechenden Rezeptoren im Dünndarmepithel. Fehlen die Rezeptoren, so sind die entsprechenden Serotypen apathogen (GIBBONS et al., 1977; TENEBERG et al., 1990; BERTSCHINGER et al., 1993). Für den Neugeborenenendurchfall der Saugferkel sind z.B. die Serotypen O8, O138, O139, O141, O147, O149 und O157 verantwortlich. Sie besitzen die Fimbrientypen F4, F5, F6 oder F41. Die Resistenz gegenüber den Fimbrientypen F4ab/ac wird rezessiv vererbt. Der Genlocus für die F4ab/ac-Rezeptoren liegt auf Chromosom 13 (PEELMAN, 1999; JØRGENSEN et al., 2003). Molekulargenetische Untersuchungen haben ergeben, dass die Resistenz gegenüber den Fimbrien F4ab/ac sehr eng mit einer Mutation im Mucin4-Gen (MUC4) korreliert. Man kann davon ausgehen, dass das MUC4-Gen auf SSC13 den F4ab/ac-Locus beherbergt, wobei es wahrscheinlich noch einen zweiten Genort gibt, der eng gekoppelt dazu liegt (RASSCHAERT et al., 2007; PENG et al., 2007).

E.-coli mit dem Fimbrientyp F18 sind für Diarrhoe bei Absetzferkeln bzw. Ödemkrankheit verantwortlich. Die F18-Rezeptoren werden im Gegensatz zu den F4-Rezeptoren erst ab der dritten Lebenswoche exprimiert. Der Genlocus des *E.coli*-F18-Rezeptors (ECF18R) liegt auf Chromosom 6 (VÖGELI et al., 1996), eng gekoppelt oder sogar identisch mit dem Gen der α -(1,2) Fucosyltransferase (MEIJERINK et al., 1997).

Für das Vorhandensein der F4- und F18-Rezeptorvarianten gibt es Gentests, die in praxi für die Resistenzzüchtung genutzt werden (VÖGELI et al., 1997). Leider stehen diese Tests aufgrund patentrechtlicher Vorgaben nicht für alle potentiellen Nutzer zur Verfügung.

2.1.4.3 Parasitosen

Bekannt sind natürliche Resistenzen gegenüber einigen Nematoden, z.B. *Strongyloides ransomi* (JOHNSON et al., 1975) und *Ascaris suum* (WAKELIN, 1978). Nach neueren Untersuchungen gibt es hochsignifikante Resistenz-/Empfindlichkeitsunterschiede im F2-Modell nach Infektionen mit *Trichuris suis* und *Ascaris suum* (NEJSUM et al., 2006). Auffällig ist, dass Tiere die resistent gegenüber *Ascaris* auch resistent gegenüber *Trichuris* sind. Ebenso ist eine Resistenz gegenüber *Trichinella spiralis* nach Versuchen mit ingezüchteten Minischweinen bekannt (LUNNEY & MURREL, 1988). Der auf einem immunvermittelten Abbau der enzystierten Larven in der Muskulatur beruhende Resistenzmechanismus konnte mit Genen im Bereich des MHC-Komplexes in Verbindung gebracht werden (MADDEN et al., 1990; MADDEN et al., 1993). Von REINER et al. (2002a) wurden bei Infektionsversuchen mit *Sarcocystis (S.) miescheriana* Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den Rassen *Meishan* (ME) und *Pietrain* (PI) aufgedeckt. Auch gegenüber dem Schweinefinnenbandwurm *Taenia solium* gibt es Hinweise auf eine Resistenz (SCIUTTO et al., 2003).

Um Hinweise auf Genvarianten, die für die Ausprägung von Empfindlichkeiten/Resistenzen verantwortlich sind, zu identifizieren, bedient man sich moderner Genomanalyseverfahren (Kapitel 2.2).

2.2 Genomanalyse

2.2.1 Was ist Genomanalyse?

Das primäre Ziel der Genomanalyse ist, die Ursachen phänotypischer Variation auf molekularer Ebene zu identifizieren. Gene und Genvarianten sowie deren Auswirkungen auf den Phänotyp sollen detailliert aufgeschlüsselt werden. Im Bereich der Nutztierzüchtung konzentriert sich die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse v.a. auf die Verbesserung der tierischen Leistung und Gesundheit. Seit der Domestikation der Nutztierarten Rind, Schaf, Ziege und Schwein vor etwa 10.000 Jahren sowie des Huhns vor etwa 4.500 Jahren verfolgt die Tierzucht das Ziel, Tiere in für den Menschen nützlichen Merkmalen zu optimieren (ANDERSSON, 2001). Zumeist geschah dies, indem der Züchter sichtbare Parameter als Selektionskriterien nutzte. Erst durch die Einführung der quantitativen Genetik am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde eine systematischere und objektivere Auswahl der besten Zuchttiere auf der Basis genotypischer Informationen ermöglicht.

Der Phänotyp eines Individuums wird durch qualitative und quantitative Merkmale bestimmt. Die qualitativen Merkmale werden von einem bzw. wenigen Genen und nur wenig von Umweltfaktoren beeinflusst. Hierzu zählen Erbfehler, Haut- und Haarfarbe, Blutgruppen etc. Quantitative Merkmale hingegen werden meist oligo- bzw. polygen, d.h. durch zumindest mehrere Gene mit unterschiedlichen Einzeleffekten bestimmt. Die Varianz von quantitativen Merkmalen wird in bedeutendem Maße von Umwelteinflüssen bestimmt, weshalb quantitative Merkmale meist nur geringe Heritabilitäten aufweisen. Es existiert also ein komplexes Geflecht von Beziehungen zwischen dem Gen als primärem Träger der Erbinformation und dem für den Tierzüchter relevanten Leistungsmerkmal (SCHWERIN et al., 2000). Hier stoßen die herkömmlichen tierzüchterischen Methoden an ihre Grenzen. Durch Methoden der Genomanalyse ist es möglich, neue Parameter für die Selektion von Zuchttieren zu definieren.

2.2.2 Genomanalyse und Kandidatengene

Ein wesentliches Anliegen der Genomanalyse im Hinblick auf die Entschlüsselung von Zusammenhängen zwischen Genen, deren Varianten und Merkmalsausprägungen, ist die Definition von Kandidatengen. Kandidatengene sind Gene, von denen man annimmt, dass ihre genetische Variation einen Teil der phänotypischen Variation erklären kann (BRADE, 2003). Der Prozess der Kandidatengendefinition führt zu einer drastischen Einschränkung möglicher Gene und Genvarianten. Erst diese Eingrenzung erlaubt eine genauere Untersuchung der Kandidatengene hinsichtlich ihrer Bedeutung für Merkmalsvariationen. Hierzu stehen prinzipiell drei sich mehr oder weniger komplementierende Ansätze zur Verfügung. Erste Ansätze zur Definition von Kandidatengen ergeben sich aus deren Funktion im pathophysiologischen Zusammenhang, der Ausprägung des Zielmerkmals oder daraus, dass bereits bei einer anderen Spezies ein Zusammenhang zwischen einem Gen und demselben Merkmal nachgewiesen werden konnte. Man spricht von homolog-physiologischen Kandidatengen. Kandidatengene sind also Gene, die aufgrund ihrer bekannten Funktion grundsätzlich (physiologische Kandidatengene), bei einer bestimmten Tierart (homologe Kandidatengene), aufgrund ihrer Position im Genom (positionelle Kandidatengene) oder aufgrund ihrer differentiellen Expression, also ihrer Genprodukte, (funktionale Kandidatengene) mit der Variabilität des Zielmerkmals in Verbindung gebracht werden können.

2.2.3 Positionelle und funktionelle Genomanalyse

Positionelle Kandidatengene ergeben sich aufgrund ihrer Lage innerhalb eines bestimmten Genomabschnittes, der sich mit der Variabilität des Zielmerkmals assoziiert zeigt. Aufgrund der zunächst hohen Zahl an Kandidatengen innerhalb eines solchen Chromosomenabschnitts muss eine Eingrenzung aufgrund deren Physiologie, Homologie und/oder Funktion erfolgen.

Zur Entschlüsselung positioneller Kandidatengene dient die positionelle Genomanalyse, die auch als QTL-Analyse bezeichnet wird (HALEY & ANDERSSON, 1997). Da es sich hierbei um die Schlüsselmethodik der hier vorgestellten Arbeit handelt, wird die QTL-Analyse im Kapitel 2.2.4.3 detailliert vorgestellt.

Kernanliegen der funktionellen Genomanalyse ist die Verknüpfung von Sequenzinformationen mit funktionellen Differenzen im Transkriptom, Proteom und Metabolom.

Die funktionelle Genomanalyse beinhaltet deshalb eine systematische Genaktivitätsanalyse auf der Ebene der Messenger-RNA (mRNA) und gegebenenfalls Profilanalysen der daraus hervorgegangenen Proteine bis hin zu den Auswirkungen auf der Ebene metabolischer Vorgänge. Die Gesamtheit der aus dem Genom transkribierten mRNA wird als Transkriptom bezeichnet. Die Summe der daraus translatierten Proteine nennt man Proteom. Alle ablaufenden Stoffwechselprozesse zusammengenommen nennt man Metabolom. Für solche Untersuchungen benötigt man möglichst genau definierte Tiere, die unter exakt definierten Umweltbedingungen gehalten werden. Notwendig sind also speziell für die Fragestellung konzipierte Tiere. Auch monozygote Zwillinge haben sich bewährt (WOLF, 2004). Ebenso wichtig wie die Auswahl und Behandlung der Versuchstiere ist die Festlegung der für die entsprechenden Fragestellungen am besten geeigneten Zeitpunkte für die Entnahme repräsentativer Gewebeproben. Aus den gewonnenen Geweben erstellt man Expressionsprofile auf den Ebenen von Transkriptom, Proteom oder Metabolom.

Für die Genexpressionsanalyse auf der Ebene der mRNA werden die Unterschiede im mRNA-Profil der verschiedenen Tiere miteinander verglichen. Diese Analyse kann man mit DNA-Array-Verfahren durchführen. Man nutzt dazu DNA-Chips, auch Gen-Chips genannt. DNA-Chips sind miniaturisierte Träger, auf deren Oberfläche z.T. tausende DNA-Moleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster aufgetragen sind. Die gebundenen DNA-Moleküle werden mit komplementären markierten Nukleinsäuren hybridisiert.

Das Proteom kann analog zur mRNA mit sog. Protein-Chips, der Verwendung von Antikörpern (ELISA), der Auftrennung mittels Gelelektrophorese oder mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert werden.

DNA- und Protein-Arrays repräsentieren einen neuen Meilenstein in der Genomforschung, weil tausende von Molekülen gleichzeitig analysiert werden können (MARRA et al., 1998). Außerdem können alle aktiven Gene eines Gewebes zum Zeitpunkt der Bestimmung analysiert werden. Mit Expressionsprofilen einer ausreichend großen Zahl von Geweben sollen statistisch signifikante Korrelationen zwischen gewebspezifischen Informationen, wie z.B. Krankheitsstatus oder Genotypen, und dem Expressionsniveau von ausgewählten Genen oder Gengruppen abgeleitet werden können (BOGUSKI & SCHULER, 1995). Funktionelle Kandidatengene ergeben sich daraus, dass sie bei hinsichtlich des Zielmerkmals variablen Tieren in unterschiedlichen Graden exprimiert werden. Auf RNA-Ebene spricht man von

differentieller Expression. Funktionelle Kandidatengene können aber auch aus Protein- und Metabolitenstudien abgeleitet werden.

Als problematisch gilt allerdings der direkte Schluss von differentiellen Expressionsmustern auf die zugrunde liegenden Genvarianten. Denn es ist zunächst kaum möglich zu unterscheiden, ob die differentielle Expression eines Gens auf eine Variante im Gen selbst (cis) oder auf eine Variante in einem vorgeschalteten und zunächst unbekannten Gen (trans) beruht. Es kann also grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass im differentiell exprimierten Gen selbst keine Genvarianten erarbeitet werden können (DOSS et al., 2005). Ferner führen genomweite Expressionsstudien häufig zu einer unüberschaubaren Vielzahl differentiell exprimierter Kandidatengene. Diese können aus logistischen und ökonomischen Gründen nicht alle daraufhin untersucht werden, ob sie eine für die differierende Merkmalsausprägung mitverantwortliche Genvariante tragen (YAMASHITA et al., 2005; DOSS et al., 2005; WALKER & HUGHES, 2008).

Um kausale Zusammenhänge zwischen Genstruktur und Merkmalsausprägung aufzudecken, kann auch eine Kombination der Expressionsprofile aus funktioneller Genomanalyse (Transcriptomics) und QTL-Analysen stattfinden, woraus sog. exprimierte quantitative trait loci (eQTL) resultieren können (JANSEN & NAPP, 2001). Dabei werden die mRNA-Expressions-Spiegel von Kandidatengenen gleichzeitig als quantitative Merkmale in der QTL-Analyse in einem segregierenden Familienmaterial (z.B. F₂-Familie) behandelt (KADARMIDEEN et al., 2006). Ziel der eQTL-Analyse ist die redundante Bestätigung von Kandidatengenen auf funktioneller und positioneller Ebene. Das bedeutet, dass einem Gen welches differentiell exprimiert wird und das zugleich als QTL im Bereich seiner bekannten chromosomalen Lokalisation abgebildet wird, ein bedeutenderer Kandidatengenstatus zufällt (YAGUCHI et al., 2005, DRAKE et al., 2006). Erfolgreiche Modelle liegen bereits bei der Hefe (BREM et al., 2002), bei Nagern (SCHADT et al., 2003), beim Menschen (SCHADT et al., 2003) und beim Huhn (LIU et al., 2001) vor.

2.2.4 Genomkartierung

Ein wesentlicher Schritt auf dem Weg zur vollständigen Genomanalyse ist die Erstellung von Genkarten. In einer Genkarte werden die bekannten Genorte in ihrer relativen Lage zueinander beschrieben. Ziel der Genomkartierung (genome mapping) ist die vollständige Darstellung der Abfolge aller Sequenzen auf den Chromosomen, die Identifizierung von Genpositionen und die funktionelle Zuordnung zu phänotypischen Merkmalen und deren

Variation. In den Genkarten sind die Genloci linear angeordnet. Eine möglichst exakte und dichte Kartierung von Markerloci und Genloci ist Voraussetzung für das Auffinden von leistungsbeeinflussenden Genorten.

Es gibt zwei verschiedene Typen von Genkarten, die genetische Karte (Kap. 2.2.4.1) mit den relativen, und die physikalische Karte (Kap. 2.2.4.2) mit den absoluten Positionen der Genorte (BRENIG, 2000).

2.2.4.1 Genetische Karten

Genetische Karten verzeichnen die relativen Positionen von Genloci aufgrund statistischer Berechnungen. Grundlage für die Berechnungen sind die Rekombinationsraten, d.h. die relativen Häufigkeiten von Crossing over-Ereignissen pro Meiose zwischen den jeweiligen Markern. Maßeinheit für die Rekombinationshäufigkeit ist das Centimorgan (cM). Ein cM entspricht einer Rekombinationsrate von 1%. D.h., wenn sich in einem Kollektiv von 100 Kreuzungstieren nur eine Rekombination zwischen zwei Markern nachweisen lässt, beträgt der Abstand zwischen diesen Markern 1cM (Abb. 1).

Methodisch verwendet man Kopplungsanalysen um genetische Karten zu erstellen (siehe dazu auch 2.2.4.4 Methodik der QTL-Kartierung).

2.2.4.2 Physikalische Karten

Im Gegensatz zu den relativen Positionen der genetischen Kartierung sind die Positionen der physikalischen Kartierung zumindest theoretisch von absoluter Natur, weil sie nicht geschätzt, sondern tatsächlich gemessen werden. Es wird die absolute Lage von Genen zueinander beschrieben, sodass man definierte Genorte einem bestimmten Chromosomensegment zuordnen kann. Als Maßeinheit dient die Anzahl der Basenpaare. Die Methoden hierzu sind vielfältig, wobei die physikalische Kartierung im Endergebnis zur Ermittlung der gesamten Basenabfolge des Genoms führt (BRENIG, 2000).

Die klassischen Methoden der physikalischen Kartierung sind die *radioactive in-situ hybridisation (RISH)* und die *fluorescence in-situ hybridisation (FISH)*. Hierbei werden markierte Sonden mit der zu untersuchenden DNA direkt hybridisiert. Die hybridisierten

Bereiche lassen sich anschließend aufgrund der Markierung darstellen und physikalisch kartieren (Abb. 1).

Die Genomsequenzierung ist die umfassendste Form der physikalischen Kartierung. Für das menschliche Genom ist die Sequenzierung bereits abgeschlossen (Human Genome Project). Für die Nutztierspezies wurden internationale Initiativen zur Sequenzierung der Genome gestartet (siehe: <http://www.genome.iastate.edu/>). Die vollständige Entschlüsselung des Schweinegenoms steht kurz bevor. Für das Huhn ist bereits die gesamte Genomstruktur bekannt und in naher Zukunft wird dies auch für Rind und Pferd der Fall sein.

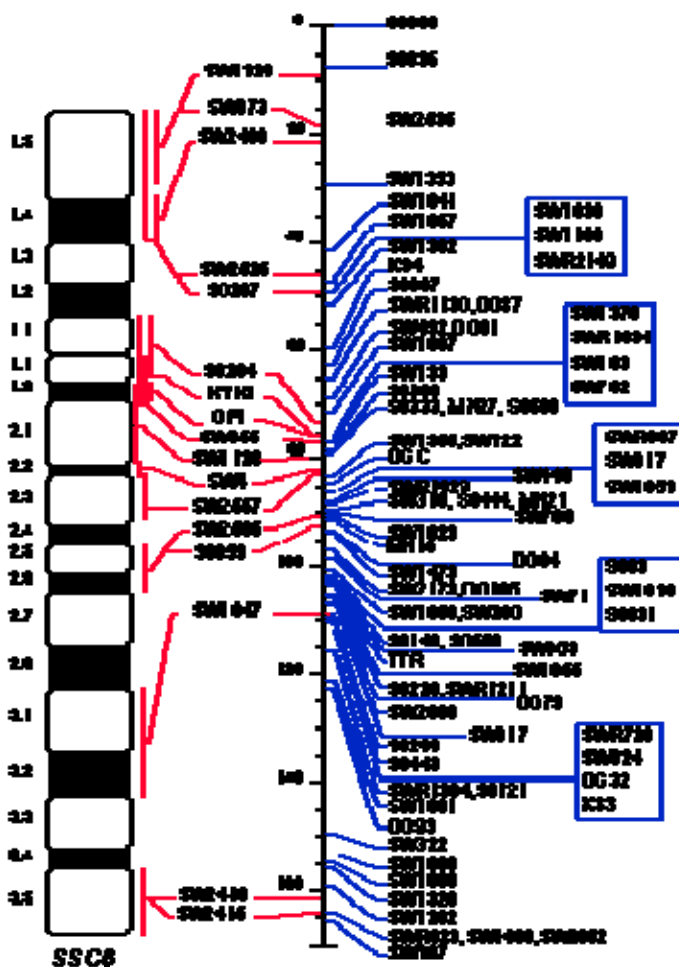


Abbildung 1: Physikalische (links) und genetische Karte (rechts) im Vergleich, SSC 6 (Quelle: <http://www.marc.usda.gov/maps/ssc06.map>)

2.2.4.3 QTL-Kartierung als Erweiterung der genetischen Kartierung

Die QTL-Kartierung ist eine Erweiterung der genetischen Kartierung. Quantitative trait loci (QTL) sind individuelle Genorte, die einen Beitrag zur Variation eines polygenen oder quantitativen Merkmals leisten (GELDERMANN, 1975). In der QTL-Analyse (HALEY & ANDERSSON, 1997) werden also Beziehungen zwischen Chromosomenbereichen und der Ausprägung quantitativer Merkmale, die meist polygen vererbt werden, aufgeschlüsselt. Das Ziel von QTL-Analysen ist die Definition von Kandidatengenen, die die Ausprägung der betrachteten Merkmale beeinflussen. Nach SEATON et al. (2002) sind QTL-Kartierungen die ersten Schritte hin zur Identifizierung der Gene, die für wichtige Merkmale in Medizin und Agrarwissenschaften kodieren. QTL-Studien haben bereits bei zahlreichen Merkmalen zu einer Eingrenzung möglicher Kandidatengene geführt. In diesem Zusammenhang bringt die QTL-Analyse einen weiteren interessanten Aspekt mit sich. Sie ist in der Lage, eine Einschätzung der Anzahl und Größe der an der Variation eines Zielmerkmals beteiligten Genorte vorzunehmen.

2.2.4.3.1 QTL bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Für alle wirtschaftlich bedeutsamen Nutztierarten sind QTL-Kartierungen von wissenschaftlichem und ökonomischem Interesse. Mit Hilfe der QTL-Analyse wurden in den letzten Jahren sehr erfolgreich Chromosomenregionen mit Bedeutung für ökonomisch relevante Merkmale erarbeitet (aktuelle Zahlen unter www.animalgenome.org/QTLdb).

Für das Rind wurden bislang 846 QTL für 91 verschiedene Merkmale ermittelt (Stand 2007). Die meisten davon für Schlachtkörpermerkmale, gefolgt von QTL für Krankheitsresistenzen und Fruchtbarkeit. Auch QTL für Verhaltensmerkmale sind bekannt. Von großer Bedeutung beim Milchrind sind QTL, die im Zusammenhang mit Milchproduktionsmerkmalen (KÜHN et al., 1999) stehen. Hierzu zählen z.B. QTL für Milchmengen und –gehaltsmerkmale wie Milchproteine (z.B. Kaseine) und Milchfette.

Beim Wirtschaftsgeflügel wurden bisher 657 QTL für 112 verschiedene Merkmale kartiert, größtenteils für Merkmale, die das Wachstum und die Eimenge/-qualität betreffen, aber auch einige QTL für Verhalten.

Beim Schaf sind mittlerweile 40 QTL für 24 verschiedene Merkmale kartiert. Ungefähr die Hälfte für Merkmale der Parasitenresistenz v.a. gegenüber Magen-/Darmnematoden (BEH, et al., 2002; DAVIES et al., 2006), aber auch einige für Merkmale der Wollbeschaffenheit. Im Bereich des Aquafarming besteht ebenfalls Interesse an der Erforschung von QTL. Die Forschung in diese Richtung ist noch relativ jung, und bedeutende Ergebnisse sind gegenwärtig noch nicht vorhanden.

2.2.4.3.2 QTL beim Schwein

Seit der ersten QTL-Kartierung beim Schwein (ANDERSSON et al., 1994) sind mittlerweile fast 1700 QTL aus ca. 110 Publikationen für 281 verschiedene Merkmale beschrieben worden (www.animalgenome.org/QTLdb). Die meisten von ihnen, ca. 1300, für Merkmale der Produktqualität. Ebenso QTL für Fruchtbarkeitsparameter und einige wenige QTL für Krankheitsresistenzmerkmale (Kap. 2.2.4.3.3).

Die meisten QTL zeigen nur geringe Effekte. Einige aber wirken sich stark auf die Merkmalsausprägung aus, zeigen evtl. sogar Einzelgencharakter. Für das Merkmal Bemuskelung sind signifikante QTL-Effekte, auf 11 Chromosomen verteilt, kartiert. Untersuchungen zu QTL, die Muskulaturmerkmale (Größe, Anzahl und Typ von Muskelfasern), Schlachtkörpermerkmale (Magerfleischanteil) und Fleischqualitätsmerkmale (pH-Wert, Leitfähigkeit) beeinflussen, sind zahlreich (KARLSKOV-MORTENSEN et al., 2006; WIMMERS et al., 2006).

Einige QTL für Fruchtbarkeitsmerkmale, wie z. B. die Wurfgröße, sind bekannt. Bedeutend ist das Östrogenrezeptor-Gen (ESR) auf Chromosom SSC1 (MESSER et al., 1996a/b; ROTHSCCHILD et al., 1996; VINCENT et al., 1997; LI et al., 1998; ZHAO et al., 1998; ROTHSCCHILD et al., 2000; CAMPBELL et al., 2003; HU et al., 2005). Das sogenannte Meishan-Allel des Östrogenrezeptors wirkt sich besonders günstig auf die Fruchtbarkeit aus.

2.2.4.3.3 QTL für Krankheitsresistenz

Beim **Rind** konnten QTL für Merkmale der Parasitenresistenz (HANOTTE et al., 2003), der Mastitisresistenz (HERINGSTAD et al., 2000; HOLMBERG & ANDERSSON-EKLUND,

2004) sowie QTL für die Zahl somatischer Zellen im Gemelk kartiert werden (REINSCH et al., 1998).

Beim **Wirtschaftsgeflügel** liegen eine Reihe von QTL für Krankheitsresistenz vor, insbesondere solche bezüglich Marek'scher Krankheit (YONASH et al., 1999) und Immunreaktivität nach Impfung gegen New Castle Disease (YONASH et al., 2001). YUNIS et al. (2002) beschrieben QTL für die Antikörperbildung nach Impfungen mit *E. coli*- und *Salmonella enteritidis*-Impfstoffen.

Über die Hälfte der beim **Schaf** erarbeiteten QTL wurden für Merkmale der Parasitenresistenz erforscht, insbesondere gegenüber Magen-/Darmnematoden der Gattungen *Nematodirus* und *Trichostrongylus* (BEH, et al., 2002; DAVIES et al., 2006).

Auch bei **Mäusen** sind schon seit längerem QTL für Parasitenresistenzen gegenüber Leishmanien (ROBERTS et al., 1997) und Plasmodien (HERNANDEZ-VALLADARES et al., 2004), den Malaria-Erregern, bekannt.

Für das **Schwein** wurden bisher nur wenige QTL für Merkmale der Krankheitsresistenz erarbeitet (www.animalgenome.org/QTLdb; Stand 2008), darunter QTL für Krankheitsresistenz im eigentlichen Sinne und QTL für Merkmale der Immunreaktivität.

QTL mit Assotiationen zum Immunsystem wurden beim Schwein zuerst von EDFORS-LILJA et al. (1994, 1998) kartiert. Die weltweit ersten QTL für Resistenz gegenüber einer Infektionskrankheit wurden am Beispiel des *Pseudorabiesvirus*, dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, beschrieben (REINER et al., 2002b). Sie liegen auf den Chromosomen 5, 6 und 9.

QTL-Studien für Resistenzen gegenüber parasitären Erkrankungen beim Schwein wurden bislang nicht durchgeführt.

2.2.4.4 Methodik der QTL-Kartierung

Um Genorte, die quantitative Merkmale beeinflussen, zu identifizieren und zu kartieren, müssen im Wesentlichen vier Voraussetzungen erfüllt sein (FALCONER & MACKAY, 1996; HALEY & ANDERSSON, 1997; REINER, 2003):

- I. Geeignetes Tiermodell
- II. Standardisierte Aufzucht und Infektion
- III. Geeignete Laborverfahren, Genkarten und Genmarker
- IV. Geeignete statistische Verfahren

2.2.4.4.1 Berücksichtigung informativer Tiergruppen

Um Zusammenhänge zwischen phänotypischen Resistenzmerkmalen und Genmarkern ermitteln zu können, werden informative Tiergruppen benötigt, in denen einerseits die betrachteten Marker verschiedene Allele aufweisen und gleichzeitig Unterschiede im Zielmerkmal bestehen. Beim Schwein verwendet man deshalb sogenannte Referenzpopulationen, wie z.B. die in Abbildung 2 dargestellten F_2 - oder R_1 -Rückkreuzungsgenerationen (ANDERSSON et al., 1994; ROHRER et al., 1996; HALEY & ANDERSSON, 1997). Für die QTL-Analyse eignet sich das F_2 -Modell mit zwei genetisch und phänotypisch stark unterschiedlichen Ausgangsrassen (HALEY & ANDERSSON, 1997), weil Familien, die durch Kreuzung genetisch diverser Elterntiere gebildet werden, wegen der Vielzahl segregierender Marker-Allele besonders informativ sind und sich oft auch extrem hinsichtlich des Zielmerkmals unterscheiden. Hierfür werden beispielsweise Kreuzungen zwischen Wildschwein und Hausschwein (ANDERSSON et al., 1994) sowie zwischen europäischen und asiatischen Schweinerassen durchgeführt (ROHRER & KEELE, 1998a, b; REINER et al., 2002b; GELDERMANN et al., 2003).

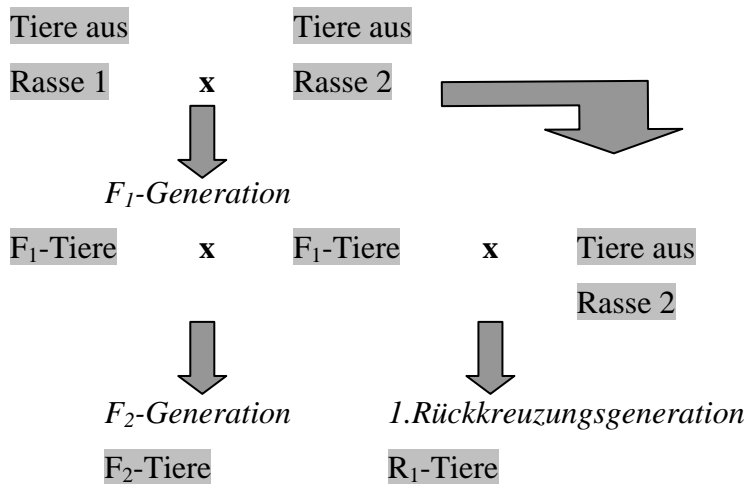
Eltern- oder Parentalgeneration

Abbildung 2: Schema zur Erstellung einer F₂- und einer Rückkreuzungsgeneration.

Laut HALEY & ANDERSSON (1997) ist das F₂-Modell zur Aufdeckung von QTL für additive Geneffekte und zur Schätzung des Dominanzgrades dieser QTL besser geeignet als das Rückkreuzungsmodell. Die QTL-Kartierung erfolgt in der sich phänotypisch und genetisch aufspaltenden F₂-Generation. Die Positionen auf den Chromosomen, an denen eine maximale Kopplung zwischen klinischem Bild und Herkunft der Allele bezüglich der Ausgangsrassen im F₂-Modell besteht, werden mit Hilfe der QTL-Analyse (HALEY & ANDERSSON, 1997) berechnet. Die notwendige Anzahl der zu untersuchenden Nachkommen kann je nach Informativität der einbezogenen Marker differieren. In einer F₂-Generation wird die QTL-Kartierung umso genauer, je mehr Tiere in die Untersuchungen einbezogen werden.

Für QTL-Analysen beim Rind verwendet man häufig das sog. Granddaughter-Design (WELLER et al., 1990). Hierbei basieren alle für die Untersuchung herangezogenen Familien auf einem Bullen (Grandsire), dessen Söhne als Zuchtbullen (Sires) eingesetzt werden. Auf der Basis von mindestens 100 leistungsgeprüften Töchtern wird im Anschluss der Zuchtwert der Sires geschätzt. Die QTL-Kartierung erfolgt, indem die Segregation von genetischen Markern, wie z.B. Mikrosatelliten vom Grandsire auf die Sires in Abhängigkeit von deren Zuchtwert untersucht wird.

2.2.4.4.2 Auswahl geeigneter Marker

Bei Säugetieren sind die Gene auf den Chromosomen linear aufgereiht. Die Gesamtheit der Chromosomen stellt das Genom dar. Die Größe der Genome landwirtschaftlicher Nutztiere ist mit ca. 3 Mrd. Basen vergleichbar mit dem des Menschen. So werden für das Schwein 2,6 – 3,0 Mrd. Basen angegeben (SCHMITZ et al., 1992; AL BAYATI et al., 1999). Nicht einmal die Hälfte aller Basen wird überhaupt transkribiert. Diese Fraktion lässt sich unterteilen in die kodierenden Exons und die nicht kodierenden Sequenzen (Introns). Zwischen den kodierenden Abschnitten liegen also längere Abfolgen von Basen, die nicht für Aminosäuren codieren. Hier finden sich auch repetitive Sequenzen (Mini-, Mikrosatelliten).

Für die genetische Kartierung benötigt ein Marker segregierende Allele, das heißt erkennbare Varianten bei den in das Experiment einbezogenen Founderlinien. Neben Variantenreichtum sind die Markerabstände entscheidend. Das Genom des Schweins mit einer Länge von ca. 2,3 Morgan kann mit etwa 100 hochpolymorphen Markern so abgedeckt werden, dass die durchschnittlichen Markerabstände etwa 20-30 cM (Centimorgan) betragen. Ein Centimorgan ist der nach T.H. Morgan benannte Abstand zwischen Genen zweier Genloci auf einem Chromosom, der durch eine Rekombinationshäufigkeit von 1% charakterisiert ist. Die prozentuale Häufigkeit der Crossing over wird also in Centimorgan umgerechnet.

Der Bereich von 20-30 cM umfasst ca. 15 bis 20 Mio. Basenpaare und 300 bis 400 Gene. Durchschnittliche Markerabstände von 20 bis maximal 50 cM werden für die genomweite Suche nach QTL als ausreichend angesehen (DARVASI et al., 1993). Denn die Wahrscheinlichkeit, mit der ein QTL bei bestimmtem Signifikanzniveau kartiert werden kann, hängt in erster Linie von der untersuchten Nachkommenzahl und der Stärke der QTL-Effekte ab, weniger von der Markerdichte (HALEY & ANDERSSON, 1997).

DNA-Polymorphismen mit bekannter Position auf den Chromosomen werden als DNA-Marker bezeichnet. Die meisten DNA-Marker haben eine unbekannte Funktion. Da aber die DNA-Marker gemeinsam mit den Genen in ihrer Nachbarschaft auf den Chromosomen an die Nachkommen weitervererbt werden, lässt sich der Erbgang aller Gene in der Nachbarschaft der Marker verfolgen.

DNA-Marker werden üblicherweise in Typ I- und Typ II-Marker eingeteilt. Typ I-Marker sind direkt in den Genen lokalisiert, wohingegen Typ II-Marker in den nicht kodierenden Bereichen der DNA liegen. Insbesondere gehören zu den Typ II-Markern die

hochpolymorphen Loci der repetitiven DNA, auch *Variable Number of Tandem Repeats* (VTNR) genannt. Diese repetitive DNA-Sequenzen machen im eukaryotischen Genom etwa 30 % aus (BRITTEN & KOHNE, 1968). Die Einteilung erfolgt nach der Länge der repetitiven Sequenzen in Mini- und Mikrosatelliten.

Minisatelliten bestehen aus Repeats von 10 bis 100 bp (Basenpaaren), wobei die Zahl der Wiederholungen pro Locus von 2 bis 100 reicht. Minisatelliten sind häufig in Clustern angeordnet, die vor allem in den terminalen Bereichen der Chromosomen vorkommen.

Für Mikrosatelliten werden viele synonyme Begriffe verwendet (*Simple Tandem Repeats*, *STR*; *Simple Sequence Length Polymorphisms*, *SSLP*; *Short Sequence Repeats*, *SSR*). Sie bestehen pro Locus aus Tandem-Repeats einer Gesamtlänge bis etwa 200 bp, meist jedoch von weniger als 30 bp. Die Längen der Wiederholungseinheiten sind kleiner als 10 bp (meist zwischen 1 und 4 bp) bei einer Zahl an Wiederholungen der Repeat-Einheit von etwa 5-15 pro Locus.

Mikrosatelliten-Marker eignen sich besonders gut für genetische Kartierungen, weil sie hochpolymorph sind und kontinuierlich im Genom verteilt liegen. Der Informationsgehalt eines Markers ergibt sich aus der Häufigkeit, mit der die Markerallele von den Eltern an ihre Nachkommen vererbt werden (SCHELLANDER & WIMMERS, 1999). Für das Schwein sind mittlerweile über 4000 genetische Marker kartiert (Pigbase 2006 [<http://iowa.thearkdb.org/>]).

Noch besser als Mikrosatelliten eignen sich Einzelbasenpaar-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, *SNPs*), da sie in sehr viel größerer Anzahl vorkommen als Mikrosatelliten. Dies gilt insbesondere für Feinkartierungen. Allerdings steht noch keine wirklich geeignete Methode zur Verfügung, um genomweite Untersuchungen mit SNPs durchführen zu können.

2.2.4.4.3 Darstellung von Mikrosatelliten

Zur Darstellung von Mikrosatellitenloci verwendet man in den meisten Fällen die Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu werden Primer für die flankierenden DNA-Sequenzen des betrachteten Mikrosatellitenlocus konstruiert. Die hiermit aus der genomischen DNA amplifizierten Fragmente, also die Mikrosatellitensequenzen, werden durch elektrophoretische Auftrennung dargestellt. Die Fragmentlängen der Mikrosatelliten-PCR-Produkte liegen im Durchschnitt zwischen 100 und 300 bp. Da sich die Größe zweier Allele

eines Locus um nur ein Basenpaar unterscheiden kann, ist zu ihrer Analyse eine gelelektrophoretische Auftrennung in hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgelen notwendig.

Um die Fragmentlängen genau bestimmen zu können, müssen flankierend zu den Amplifikaten sog. Längenstandards mit aufgetragen werden. Die Auftrennung und folgende Darstellung der Fragmente zum Nachweis der Allele des betreffenden Locus wird auch als Fragmentlängenanalyse bezeichnet. Die Fragmentlängenanalyse findet meistens in DNA-Sequenzierautomaten statt. Hierzu müssen die Primer fluoreszenzmarkiert sein, um die Fragmente detektieren zu können. Das Verfahren zur Darstellung einzelner Mikrosatellitenloci geht auf NAKAMURA et al. (1987) zurück. Alternativ zur gelelektrophoretischen Auftrennung wird für die Analyse unterschiedlich langer Fragmente auch die Massenspektrometrie verwendet.

Um mehr Effektivität für die aufwendige Mikrosatellitenanalyse zu erreichen, können auch mehrere Mikrosatellitenloci in einem PCR-Ansatz amplifiziert werden (Multiplex-PCR).

2.2.4.4.4 Kopplungsanalyse (linkage mapping) und QTL-Kartierung

Die genetische Kartierung basiert auf der Erfassung von Rekombinationsraten, die als Messwerte für die Abstände zwischen Markern benutzt werden. Anhand dieser Werte können die Markerabstände in Centimorgan (cM) berechnet werden, wodurch eine Kopplungskarte entsteht. Nach der Erstellung der Kopplungskarte werden die Wahrscheinlichkeiten für jeden Chromosomenabschnitt cM-weise berechnet und Kopplungsanalysen zwischen den Markern und den definierten quantitativen Merkmalen durchgeführt. Dies geschieht, um eventuelle Assoziationen zwischen genetischem Marker und Merkmal feststellen zu können. In der Population weist ein Kopplungsungleichgewicht zwischen Marker und Leistungsmerkmalen und in segregierenden Familien die Co-Segregation von Marker und Leistungsmerkmal auf eine enge Kopplung von Marker und QTL hin.

Positionen auf Chromosomen, an denen eine maximale Kopplung zwischen Phänotyp und Herkunft der Allele bezüglich der Ausgangsrassen besteht, werden mit Hilfe der QTL-Analyse (HALEY & ANDERSSON, 1997) berechnet.

Chromosom für Chromosom wird schrittweise im cM-Abstand die Relation zwischen der erklärten Merkmalsvarianz, die sich aus Additiv- und Dominanzbeitrag zusammensetzt, und der Restvarianz berechnet (F-Ratio). Dabei führt ein großer Anteil der erklärten Varianz an der Gesamtvarianz des Merkmals in der F₂-Generation zu hohen F-Werten. Die Position des QTL liegt dort, wo der höchste F-Wert erreicht wird. So zeigen z.B. bei der Suche nach QTL für Krankheitsresistenz an der Position des idealen QTL alle resistenten Tiere nur Allele der resistenten Founderrasse und alle empfindlichen Tiere nur Allele der empfindlichen Founderrasse, während sich mischerbige Tiere intermediär verhalten.

Pro Chromosom und F₂-Familie entsteht so ein typisches QTL-Profil. Für die Position des QTL gilt ein sog. Vertrauensintervall, in dem mit bestimmter Wahrscheinlichkeit der die Merkmalsvarianz verursachende Locus bzw. ein Cluster an Loci liegt. Die Breite des Vertrauensintervalls ist in erster Linie von der Anzahl informativer Meiosen und damit von der Anzahl der in den Versuch einbezogenen Individuen abhängig (HALEY & ANDERSSON, 1997).

2.2.4.5 Kandidatengensuche und vergleichende Kartierung (comparative gene mapping)

Um Zusammenhänge zwischen Marker bzw. QTL und möglichen positionellen Kandidatengenen besser zu verstehen, ist die vergleichende Genomkartierung ein wichtiges Werkzeug, indem Ergebnisse speziesübergreifend ausgetauscht und verifiziert werden (PINTON et al., 2000).

Nach erfolgreicher Durchführung der QTL-Analyse werden die vermeintlich wichtigen Genorte, entsprechend die bedeutsamsten QTL mit hohen F-Werten durch vergleichende Kartierung den sehr dicht besetzten Genkarten von z.B. Maus, Ratte und Mensch gegenübergestellt (Abb. 3 und 4). Es geht zunächst darum, positionelle Kandidatengene mit homolog-physiologischen Kandidatengenen abzugleichen, um eine sinnvolle Eingrenzung für Folgeuntersuchungen vornehmen zu können.

Die vergleichende Kartierung ist nur möglich, weil sowohl die kodierenden Sequenzen als auch die Anordnung der Gene (Syntenie) in einem bestimmten Chromosomenabschnitt und die Organisation der Genome zwischen verschiedenen Säugerspezies stark konserviert sind (CHOWDHARY et al., 1998; ANDERSSON, 2001). Gelingt es, den bei einer Nutztierspezies als für ein Merkmal relevant identifizierten Chromosomenabschnitt dem homologen Chromosomenbereich von Maus, Ratte oder Mensch zuzuordnen, kann das vorhandene Wissen über eben diesen Bereich hinsichtlich möglicher Kandidatengene in dieser Region für die Nutztierspezies verwendet werden.

Sind interessante Genabschnitte bekannt, kann man diese Bereiche einer Feinkartierung unterziehen. Das Fernziel einer Feinkartierung ist die Identifizierung der dem QTL zugrunde liegenden kausalen Mutation, also letztendlich die Identifikation der für die phänotypische Variation verantwortlichen Gene und Genvarianten.

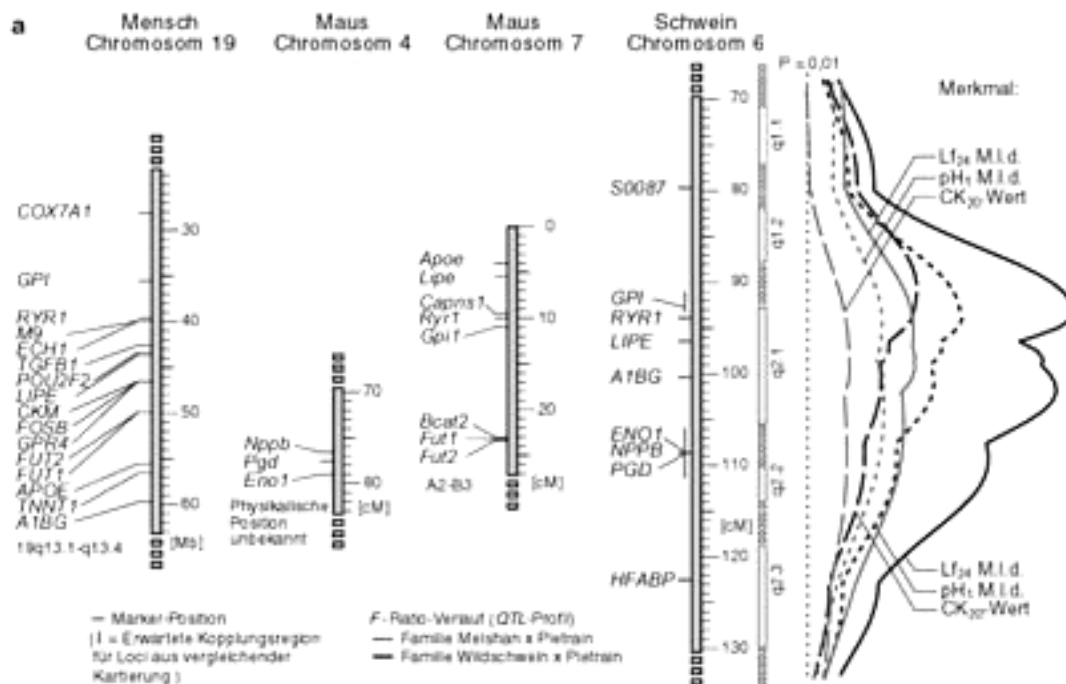


Abbildung 3: Vergleichende Kartierung von Mensch, Maus und Schwein (SSC6) (Quelle: Tier-Biotechnologie, Geldermann, 2005, UTB).

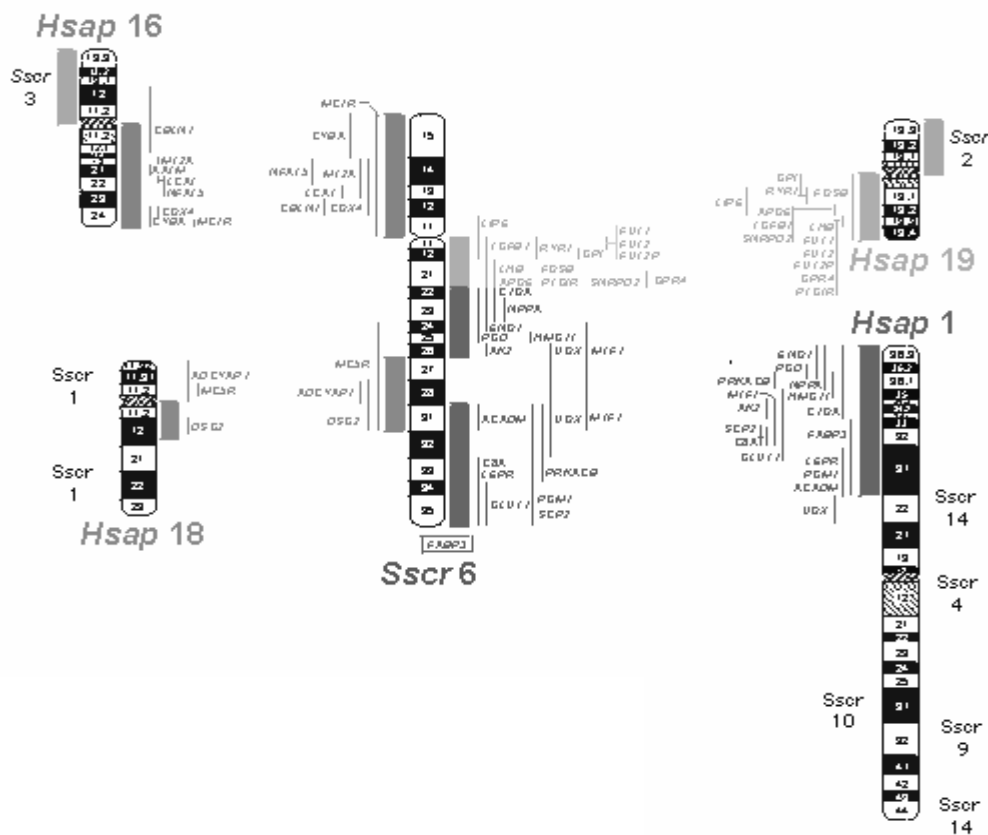


Abbildung 4: Vergleichende Kartierung von Mensch und Schwein (SSC6) (Quelle: <http://www2.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSCHTML/SSC6S.HTM>).

2.2.5 Nutzen von Genomanalyseverfahren in der Tierzucht

Der vielfältige Informationsgewinn durch positionelle und funktionelle Genomanalyseverfahren über Genom, Stoffwechsel und Umweltfaktoren sowie deren Verknüpfungen untereinander lässt die Identifikation weiterer Kandidatengene erwarten.

Sind Kandidatengene und die verantwortlichen Genvarianten bekannt, so können die gewünschten Varianten mittels Marker gestützter Selektion (marker assisted selection, MAS) in Zuchtprogramme integriert werden (LANDE & THOMPSON, 1990; HOSPITAL et al., 1992; MEUWISSEN & van ARENDONK, 1992; SOLLER, 1994). Dies kann auch bereits bei hinreichend enger Kopplung zwischen QTL und Marker vorgenommen werden. Je weniger Gene z.B. an der Merkmalsausprägung bzw. der Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber einem

bestimmten Infektionserreger beteiligt sind, desto eher wird eine praktikable Nutzung realisierbar sein. Sind die Gene für erwünschte/unerwünschte Merkmale bekannt, können diese auch direkt für die Selektion verwendet werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als gene assisted selection (GAS).

Genvarianten lassen sich also nur in Zuchtprogrammen verwenden, wenn dafür direkte (Gennachweis) oder indirekte (Markernachweis) Gentests verfügbar sind. Mittlerweile wird eine Vielzahl dieser Gentests, teilweise auch in kommerziellen Populationen, eingesetzt (STRANZINGER & WENT, 1996; SIMIANER, 2000).

MAS und GAS weisen gegenüber der phänotypischen Selektion große Vorteile auf. Sie ermöglichen eine Selektion unabhängig von Geschlecht und Alter. Außerdem können sie bei polygen bedingten Eigenschaften zur Anwendung kommen (AMMANN & VOGEL, 2000). Allerdings ist zu beachten, dass der größte Selektionserfolg nur in Kombination von MAS und Methoden der Zuchtwertschätzung zu erreichen ist.

Nach KALM (2000) bietet die markergestützte Selektion innerhalb von Tierfamilien folgende Vorzüge:

- 1.: Verkürzung des Generationsintervalls durch Selektion an Nachkommen vor deren Merkmalsausprägung (z.B. Embryonen, Neugeborene).
- 2.: Verbesserung der Selektionsgenauigkeit durch Nutzung von Genominformationen.
3. : Erhöhung der Selektionsintensität durch Einbeziehung einer größeren Zahl von Tieren oder einer besseren Differenzierung zwischen Voll- und Halbgeschwistern.

Gelänge es Gene oder Genbereiche zu identifizieren, die z.B. die Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber Krankheitserregern beeinflussen, so könnten diese mittels MAS in Tierpopulationen heraus- bzw. eingekreuzt werden. Über das gesamte Vorgehen gibt Abbildung 5 einen Überblick.

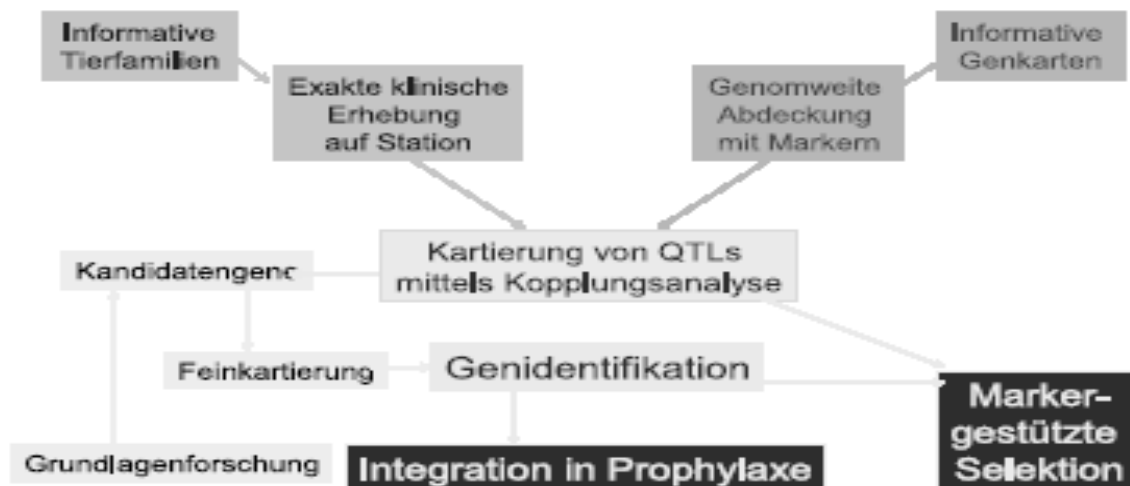


Abbildung 5: Möglicher Ansatz zur Kartierung von Krankheitsresistenzloci (REINER, persönliche Mitteilung)

Eine wesentliche Voraussetzung zur Auffindung von QTL für Krankheitsresistenz ist allerdings das Vorliegen eines geeigneten Tiermodells. REINER et al. (2002b) beschreiben erhebliche Resistenzunterschiede zwischen Meishan und Pietrain bezüglich des Protozoen *Sarcocystis miescheriana*, die von ihrer Ausprägung für die QTL-Kartierung geeignet erscheinen.

Im folgenden Abschnitt wird das Modell vorgestellt.

2.3 Sarcocystis miescheriana

2.3.1 Kokzidien im Überblick

Die Unterklasse der Kokzidien, die zum Stamm der Apicomplexa gehören, umfasst eine Vielzahl von einzelligen Parasiten bei Wirbeltieren.

Kokzidien ohne Wirtswechsel wie *Eimerien* und *Cryptosporidien* werden direkt von Tier zu Tier übertragen. *Eimerien* spielen eine große Rolle als Durchfallerreger bei Wiederkäuern (z.B. *Eimeria bovis*) und beim Geflügel (z.B. *Eimeria tenella*), weniger beim Schwein (z.B. *Isospora suis*). *Cryptosporidium parvum* verursacht typische Jungtier-Diarrhoe, vor allem beim Kalb, ist aber auch ein bedeutender Zoonose-Erreger.

Zu den heteroxenen Kokzidien (mit Wirtswechsel) gehören z.B. die Gattungen *Toxoplasma* und *Sarcocystis*. *Toxoplasma gondii* ist an Aborten (präinatale Toxoplasmose) und angeborenen Schäden (koninatale Toxoplasmose), u. a. bei Schwein, Schaf, Ziege und dem Menschen, beteiligt. Endwirt bei *Toxoplasma* sind nur Hauskatzen und einige wildlebende Feliden. Latente *Toxoplasma*-Infektionen kommen häufig und bei Schweinen in aller Welt vor (DUBEY, 1994). Sauen sind häufiger infiziert als Mastschweine (DUBEY et al., 1995). Werden Katzen von Ställen und Futterlagern fern gehalten, sind *Toxoplasmen* keine Gefahr. Veterinärmedizinisch gesehen, sind *Toxoplasmen* als Erreger von Aborten bei trächtigen Schafen und Ziegen von Bedeutung.

Die Gattung *Sarcocystis* umfasst weltweit mehr als 130 Arten mit unterschiedlicher Pathogenität bei Säugetieren, Vögeln und Fischen (TENTER, 1995). Insbesondere für Wiederkäuer stellen sie ein Problem dar. *Sarcocystis cruzi* kann beim Rind Anorexie, Fieber, Anämie, Bewegungsunlust, Gewichtsverlust, Haarverlust und Aborte verursachen. Beim Schaf führt *Sarcocystis gigantea* zu markanten Zysten in der Oesophagusmuskulatur, ist aber apathogen. Eine *Sarcocystis tenella*-Infektion führt beim Schaf zu den beim Rind beschriebenen Symptomen.

Die vom Hund übertragenen *Sarcocystis*-Arten der Wiederkäuer und des Schweines sind für nichtimmune Zwischenwirte pathogen.

Das Schwein ist für drei Sarkosporidienarten Zwischenwirt. Bei *Sarcocystis miescheriana* (*S. miescheriana*) sind Hund und Waschbär, bei *Sarcocystis suihominis* der Mensch (Zoonose), und bei *Sarcocystis porcifelis* die Katze Endwirte.

2.3.2 *Sarcocystis miescheriana*

Der Erreger *S. miescheriana* wurde für diese Untersuchung exemplarisch für die Gruppe der einzelligen Parasiten ausgewählt. Er eignet sich besonders gut für Infektionsversuche, weil es sich bei ihm um keinen Zoonoseerreger handelt. Aufgrund der obligaten Heteroxenität ist er auch nicht direkt von Schwein zu Schwein übertragbar. Erreger der Gattung *Sarcocystis* sind weltweit verbreitet und ökonomisch relevant. Das unterstreicht die Notwendigkeit solcher Untersuchungen. Zudem sind die klinischen Erscheinungen nach einer standardisierten Infektion relativ mild. Dies ist unter tierschützerischen Aspekten in Tierversuchen vorteilhaft.

Taxonomie:

Reich:	Protozoa
Stamm:	Apicomplexa
Klasse:	Sporozoea
Unterklasse:	Coccidia
Ordnung:	Eimeriina
Familie:	Sarcocystidae
Gattung:	<i>Sarcocystis</i>
Art:	<i>Sarcocystis miescheriana</i>

Bei *S. miescheriana* handelt es sich um einen zur Gattung *Sarcocystis* gehörenden obligat heteroxenen (zweiwirtigen) intrazellulär parasitierenden Einzeller. Das Schwein ist Zwischenwirt, Hund (ROMMEL et al., 1974) und Waschbären (PRESTWOOD et al., 1980; HEYDORN & MATUSCHKA, 1981) sind Endwirte. *S. miescheriana* bildet in der Muskulatur des Zwischenwirtes spindelförmige, gekammerte Zysten aus, die lange palisadenförmige Vorwölbungen auf der Zystenwand aufweisen. Die Zysten sind 1500 µm lang und 200 µm breit (ERBER, 1977), die Zystenwand ist 3-6 µm dick und die palisadenförmigen Vorwölbungen sind bis zu 4,8 µm lang und bis zu 1,3 µm breit (ERBER, 1977; MELHORN & HEYDORN, 1978). Die vom Endwirt Hund ausgeschiedenen, für den Zwischenwirt infektiösen, Sporozysten sind 12,6 x 9,6 µm groß (ROMMEL et al., 1974).

Die Erstbeschreibung der Zysten in der Muskulatur als milchig weiße Schläuche (MIESCHER, 1843) gelang im Jahr 1843 und später die Entdeckung von *S. miescheriana* in Schweinefleisch (KÜHN, 1865). Bis heute konnten mehr als 130 verschiedene *Sarcocystis*-

Arten (LEVINE, 1986; TENTER, 1995) bei Säugetieren, Vögeln und Reptilien beschrieben werden (BOX & DUSZYNSKI, 1978; LEVINE, 1986; MATUSCHKA, 1987).

2.3.3 Epidemiologie

Die Literatur enthält eine Fülle von Mitteilungen über das Vorkommen von Sarcosporidien in Schweinebeständen und bei Schlachtschweinen. Epidemiologische Untersuchungen für Mitteleuropa zeigen Befallsraten mit Sarkosporidien von 18 bis 35 % bei Zuchtschweinen und 6 bis 10 % bei Mastschweinen. In Deutschland entfallen hiervon 48 bis 57 % auf *S. miescheriana* und 38 % auf *S. suis* (BOCH et al., 1978; FURMANSKI, 1987). In Südhessen sind 28,6 % der Sauen (DAMRIYASA, 2001) und 72,3 % der Ferkelerzeugerbetriebe (DAMRIYASA et al., 2004) für *Sarcocystis* spp. seropositiv.

S. miescheriana ist vermutlich weltweit verbreitet (TENTER, 1995). Nach FURMANSKI (1987) kommen Sarcosporidien aufgrund der obligaten Heteroxenität in Schweinebeständen, zu denen Hunde keinen Zugang haben, und in denen die Hygieneanforderungen eingehalten werden, nicht vor. Infektionen von Sauen und Mastschweinen durch kontaminiertes Futter lassen sich aber nicht ausschließen.

2.3.4 Entwicklung und Pathogenese

Der charakteristische 3-phasige Entwicklungszyklus (Abb. 6) von *S. miescheriana* wurde erstmals 1974 detailliert beschrieben (ROMMEL et al., 1974; MELHORN & HEYDORN, 1978):

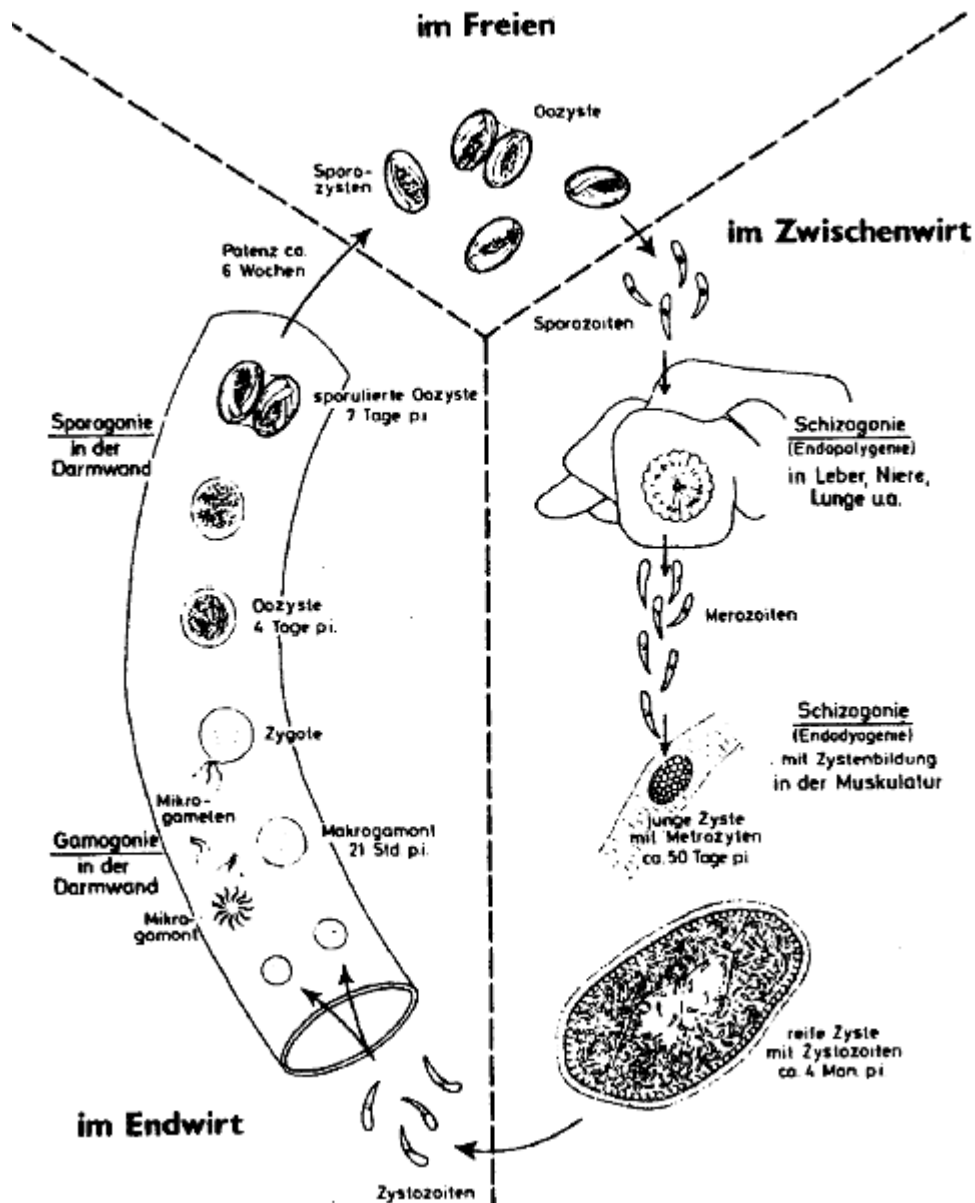


Abbildung 6: Entwicklungszyklus von *S. miescheriana* (schematisch, nach ROMMEL et al., 1979).

Das Schwein als Zwischenwirt infiziert sich oral durch die vom Endwirt über den Kot ausgeschiedenen Sporozysten. Jede Sporozyste enthält vier Sporozoiten, die im Darm freigesetzt werden. Über den Blutweg gelangen die Sporozoiten in die Leber. Hier findet am 6.-7. Tag post infectionem (p.i.) die erste Schizogonie (als Endopolygenie: durch Sprossung des Kerns entstehen mehr als 2 Tochter-Merozoiten) in Endothelzellen von venösen Lebergefäßen statt (HEYDORN et al., 1981). Ab dem 8. Tag p.i. finden sich die Merozoiten (Tochterzellen) in Endothelzellen von Kapillargefäßen aller Organe. Dort findet zwischen dem 12. und 14. Tag die zweite Schizogonie (als Endopolygenie) statt. Die Schizonten der zweiten Generation findet man vermehrt in Herz und Nieren (BARROWS et al., 1982a). Bei beiden Schizogonien können die Schizonten bis zu 100 Merozoiten enthalten (HEYDORN et al., 1981). Ab Tag 27 p.i. dringen die Merozoiten der zweiten Schizontengeneration in Muskelzellen ein, wo sie intrazelluläre dünnwandige Gewebezysten ausbilden. Danach findet eine Differenzierung der Merozoiten hin zu sogenannten Metrozyten (Mutterzellen) statt. Die Metrozyten durchlaufen weitere Schizogonien (als Endodyogenie: 2 Tochterzellen durch Längsteilung). Nach weiteren Endodyogenien entstehen die typisch bananenförmigen Zystenmerozoiten, Zystozoiten oder Bradyzoiten genannt. Ab Tag 70 p.i. liegen die nun infektiösen Zystozoiten in Form von Sarkozysten vor (ERBER & GEISEL, 1979; BARROWS et al., 1982b). Die Sarkozysten werden als Mieschersche Schläuche bezeichnet. Die Zysten sind in der Zungen-, Kau- und Zwerchfellmuskulatur besonders zahlreich zu finden. Schwächer befallen sind Schlund- und Herzmuskulatur (BARROWS et al., 1982a).

Endwirte infizieren sich durch die orale Aufnahme zystenhaltiger Muskulatur. Erst im Dünndarm werden die Zystozoiten unter Einwirkung der Gallenflüssigkeit freigesetzt und dringen dort in die Lamina propria der Mucosa ein. Hier findet die Gamogonie (geschlechtliche Vermehrung) statt, in dem sich aus den Zystozoiten männliche und weibliche Zellen, die Mikro- bzw. Makrogamonten, herausbilden. Durch Kernteilung entstehen aus einem Mikrogamonten bis zu 15 Mikrogameten. Die Makrogamonten werden innerhalb des ersten Tages p.i. von den Mikrogameten befruchtet. Danach entsteht aus der Zygote eine Oozyste, in der sich je Oozyste 2 Sporozysten mit jeweils 4 Sporozoiten entwickeln. Die fertigen Oozysten verlassen die Darmmukosa und werden mit dem Kot ausgeschieden. Hier sporulieren die Oozysten, in dem die Oozystenhülle reist. Somit liegen die Sporozysten zur Aufnahme durch den Zwischenwirt bereit.

2.3.5 Interaktionen zwischen Erreger und Wirt

Ist der *S. miescheriana*-Sporozoit bzw. -Merozoit mit Hilfe des sogenannten Apikomplexes in die Wirtszelle eingedrungen, befindet er sich nach Auflösung der parasitophoren Vakuole direkt im Zytoplasma. Die komplexe Kaskade der Immunreaktion beginnt mit der Erkennung erregerspezifischer molekularer Muster durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Als APZ fungieren vor allem Makrophagen (zirkulierende Monozyten und Gewebsmakrophagen). Die Makrophagen nehmen Parasitenantigene auf, bauen sie im Inneren durch proteolytische Enzyme ab und präsentieren die antigenen Strukturen dann mittels Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Major histocompatibility complex) -II an der Zelloberfläche (ZINKERNAGEL, 1998). Die Präsentation von Antigenen bzw. Antigenfragmenten ist eine Voraussetzung für die Immunantwort. MHC-Moleküle sind Zellmembranproteine. MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und reagieren mit CD (cluster of differentiation)-8-T-Zellrezeptoren, die sich v.a. auf zytotoxischen T-Lymphozyten befinden. Beim Schwein spielen T-Lymphozyten eine zentrale Rolle für die antigenspezifische Immunantwort bei verschiedenen Pathogenen (SAALMÜLLER, 1998).

T-Lymphozyten mit CD-8-Rezeptor sind sog. Killerzellen oder zytotoxische T-Lymphozyten, welche v.a. bei virusinfizierten Zellen reagieren. MHC-II-Moleküle hingegen finden sich auf Makrophagen und B-Lymphozyten und reagieren mit CD-4 positiven Zellen, also v.a. T-Helfer-Zellen. Undifferenzierte T-Helfer-Zellen werden durch Interleukin 12 (IL-12) zu T-Helfer-1-Zellen (Th1-Zellen), die ihrerseits Makrophagen aktivieren und die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) induzieren, ein Chemokin mit zentraler Bedeutung für die Abwehr von Protozoen. IL-12 scheint der wichtigste Auslöser für die IFN- γ Synthese zu sein (O'GARRA, 1998). IFN- γ stellt den Dreh- und Angelpunkt bei der Abwehr von *Toxoplasma gondii*-Infektionen des Menschen dar, indem es Gewebsmakrophagen aktiviert, die ihrerseits die intrazelluläre Vermehrung der Toxoplasmen unterdrücken (PRIGIONE et al., 1995; SUZUKI, 1999). SCOTT et al. beschrieben 1989, dass bei der murinen Leishmaniose Th1-Zellen vermutlich über die IFN- γ -Aktivität und die Makrophagenaktivierung einen Schutz vor einer Infektion vermitteln.

Bei mit Leishmanien infizierten Ratten stellten LEHMANN & ALBER (1998) die große Bedeutung der Th1-Zellen fest. Ratten mit geringer Th1-Zell-Antwort produzierten weniger IFN- γ und reagierten mit mangelnder Makrophagenaktivierung (LEHMANN & ALBER, 1998). Nach experimenteller Infektion von Schweinen mit *Trichinella spiralis*, einem

ebenfalls intrazellulär parasitierenden Erreger, zeigte sich ein Anstieg von MHC-II-Molekül tragenden mononukleären Zellen im Gewebe (IVANOSKA et al., 1990).

Die Th1-Antwort ist durch eine frühe Produktion von IFN- γ , die Elimination von Zellparasiten durch aktivierte Makrophagen, durch Reaktionen zytotoxischer Zellen und die Produktion von IgG2 und IgM charakterisiert (ZINKERNAGEL, 1998).

Kaninchen reagierten gegenüber *S. cruzi* mit einem Anstieg der Produktion von TNF α und NO sowie einem Anstieg der Serum-Interleukin-6-Aktivität (NAKAMURA et al., 1999).

Alle Strukturen des Immunsystems sind als genetische Information gespeichert. Jedes Individuum einer Population besitzt für sich ganz spezifische Ausprägungen des Immunsystems. Dies führt zu Empfindlichkeitsunterschieden gegenüber Infektionserregern.

2.3.6 Klinik der Sarkozystose

Für die Endwirte ist *S. miescheriana* apathogen. Für das Schwein als Zwischenwirt ist die Schwere der Erkrankung abhängig von der Infektionsdosis, also von der Anzahl aufgenommener Sporocysten und dem Immunstatus des Tieres. Mehr als eine Million aufgenommene Sporozysten führen zum Tod (HEYDORN et al.; ZIELASKO et al., 1981; BARROWS et al., 1982a; WEBER et al., 1983; SCHNEIDER & ROMMEL, 1989).

Der Krankheitsverlauf ist unterteilt in die akute (5. bis 26. Tag p.i.) und die chronische (ab Tag 27 p.i.) Sarkozystose des Schweines.

Während der akuten Sarkozystose ist eine charakteristische zweigipflige Fieberkurve mit Maxima zwischen Tag 5 und 9 p.i. (1. Schizogonie) und Tag 11-14 p.i. (2. Schizogonie) festzustellen. Während der ersten Fieberphase zeigen die Tiere Fieber bis 40 °C und ein nur geringgradig beeinträchtigtes Allgemeinbefinden. Im Verlauf der zweiten Fieberphase mit Fieber bis 42 °C kommt es je nach Menge der aufgenommenen Sporocysten zu unterschiedlich starken Symptomen wie Inappetenz, Anämie, Apathie, Dyspnoe und Zyanosen an Ohren, Rüsselscheibe und Gliedmaßen (ERBER & GEISEL, 1979; ZIELASKO et al., 1981; BARROWS et al., 1982a), Muskeltremor und schwerer Ataxie (BARROWS et al., 1982a). Tragende Sauen können verwerfen (ERBER et al., 1978; STROHLEIN, 1986). Zwischen Tag 12 und 15 p.i. kann es zum Verenden der Tiere kommen.

In der Dissertation von HEPP (2006) zeigten die mit 50.000 Sporozysten infizierten Schweine an den Tagen 12-14 p.i. einen deutlichen Anstieg der Körpertemperatur mit einem Maximum an Tag 13 p.i. (40,21°C).

Die chronische Sarkozystose ist gekennzeichnet durch das Einwandern von Merozoiten in Muskelzellen ab Tag 27 p.i.. Ist die Herzmuskulatur stark mit Zysten befallen, kann es um Tag 50 p.i. zum akuten Herztod kommen (DAUGSCHIES et al., 1989a). Zudem wird abhängig von der Infektionsdosis bei Mastschweinen eine unterschiedlich starke Reduktion der Tageszunahme beobachtet. Die Folgen sind wirtschaftliche Einbußen. Auch Fleischbeschaffenheit und Fleischqualität können beeinträchtigt sein (ERBER & GEISEL, 1979; BOCH et al., 1980; ZIELASKO et al., 1981; BARROWS et al., 1982a; DAUGSCHIES et al., 1987; DAUGSCHIES et al., 1988a).

Eine überstandene Infektion hinterlässt eine Immunität, die bei fehlender Reinfektion bereits nach 80 Tagen nachlässt und nach 120 Tagen kaum noch nachweisbar ist (DUBEY et al., 1989). Eine Kreuzimmunität zwischen *S. miescheriana* und anderen Arten wie *S. suis* besteht nicht (ERBER & GEISEL, 1979). Die Stärke der Immunität korreliert positiv mit der zur Immunisierung verabreichten Sporozystenmenge (ZIELASKO et al., 1981; SCHNIEDER & ROMMEL, 1983; SCHNIEDER et al., 1984).

2.3.7 Pathologie

2.3.7.1 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei akuter Sarkozystose kommt es durch die Zerstörung der Endothelzellen während der Schizogonie zu Blutungen in das umliegende Gewebe (O'DONOGHUE & ROMMEL, 1992). Dies führt zu einer hämorrhagischen Diathese mit Petechien und Ekchymosen in Haut, Unterhaut und perimuskulärem Bindegewebe sowie auf Thymus und den serösen Häuten von Lunge, Herz, Darm, Nieren und Blase. Außerdem kann es zu Ergüssen in die Körperhöhlen und das Perikard kommen (SCHNIEDER & ROMMEL, 1983). Im Herzmuskel können laut ERBER und GEISEL (1979) in Verbindung mit der hämorrhagischen Diathese eine Koagulopathie sowie Kapillarthrombosierung entstehen. BARROWS et al. (1982a, b)

berichten über milden Ikterus an Sklera, Bindegewebe und Fett sowie über geringgradige Splenomegalie.

Charakteristisch für chronische Sarkozystose sind die Ödematisierung der Muskulatur und die Vergrößerung der Lymphknoten (ERBER & GEISEL, 1979; ZIELASKO et al., 1981; SCHNIEDER & ROMMEL, 1983; WEBER et al., 1983).

2.3.7.2 Pathologisch-histologische Befunde

Die Histologie bei akuter Sarkozystose zeigt folgende Befunde: generalisierte hyalinschollige Muskelfaserdegeneration der Skelettmuskulatur, nichteitrige Myocarditis, Kapillarthrombosierung am Herzen, lymphohistiozytäre Myositis, milde interstitielle Pneumonie, nichteitrige periportale Hepatitis, zentrolobuläre Leberzelldegeneration, Proliferation der Gefäßendothelien und der Kupferschen Sternzellen in der Leber (ERBER & GEISEL, 1979; ZIELASKO et al., 1981; BARROWS et al., 1982a; WEBER et al., 1983).

Chronische Sarkozystose (ab Tag 27 p.i.) ist histologisch durch das Vorhandensein von Sarcozysten in Herz- und Skelettmuskulatur gekennzeichnet. Dazu gehören die vergleichsweise stark befallenen Skelettmuskeln der Zwerchfell-, Zungen-, Augen-, Oesophagus- und Hautmuskulatur. Während die Mehrzahl der Zysten reaktionslos in Muskelfasern liegen (GÖBEL et al., 1978; ERBER & GEISEL, 1979; ZIELASKO et al., 1981; WEBER et al., 1983), finden sich zeitgleich auch in Degeneration befindliche Sarcozysten, die von Entzündungszellen infiltriert werden und eine hyalinschollige Muskelfaserdegeneration herbeiführen (ERBER & GEISEL 1979; ZIELASKO et al., 1981; BARROWS et al., 1982a). SCHNIEDER et al. (1984) fanden degenerierende Zysten erst ab Tag 80 p.i..

Im Anschluß an die Degeneration der Zysten wird die Muskulatur vollständig regeneriert und repariert (WARNECKE, 1983).

2.3.7.3 Hämatologische und Serologische Befunde

Die Veränderungen des Blutbildes hängen graduell von der Infektionsdosis ab. Werden Tiere mit mehr als 1 Million Sporozysten infiziert, zeigen sie Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Megathrombozytose, Hypofibrinogenämie und verlängerte Prothombin- und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (ERBER & GEISEL, 1979; BARROWS et al., 1982a; SCHNIEDER & ROMMEL, 1983; WEBER et al., 1983; ALTFELD, 1988). Bei einer geringeren Infektionsdosis kommt es lediglich zu Leukopenie und Thrombozytopenie (BARROWS et al., 1982a). Auch in der Dissertation HEPP (2006) wurde nach Infektion mit 50.000 Sporozysten ein Abfall der Thrombozyten, Leukozyten und Lymphozyten an Tag 14 p.i. festgestellt. Außerdem beschreibt HEPP (2006) während der akuten Sarkozystose eine geringfügige Erhöhung des Kreatininspiegels und einen Anstieg des Serumbilirubinspiegels bei den infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren.

Wegen der Hämostasestörungen kann es zu einer ausgedehnten intravasalen Gerinnung (DIC) mit gesteigerten Thromboxanwerten im Blut kommen (ALTFELD, 1988; DAUGSCHIES et al., 1989b; 1989c). Die erhöhte Gefäßpermeabilität mit Petechienbildung könnte durch erhöhte Prostaglandin E₂-Spiegel mitverursacht sein (DAUGSCHIES et al., 1989b).

Ab Tag 27 p.i. kommt es zu Alterationen der Muskelzellen, mit deutlicher Steigerung der Aktivitäten der Kreatinkinase (CK), der Aspartataminotransferase (AST), der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Aldolase im Serum (ERBER & GEISEL, 1979; DAUGSCHIES, 1988b; HASCHE, 1988). In der Arbeit von HEPP (2006) konnte nach einem geringfügigen Anstieg bis Tag 28 p.i. an Tag 42 p.i. ebenfalls ein deutlicher Anstieg der AST- und CK-Aktivitäten aufgezeigt werden.

Außerdem konnte über die Versuchsdauer bei den infizierten Tieren ein stetiger Abfall der Alkalischen Phosphatase (AP) festgestellt werden.

In Untersuchungen von STROHLEIN (1986) zeigten abortierende Sauen erhöhte Prostaglandin F_{2α}-Spiegel.

Die Antikörperproduktion setzt erst ab Tag 14 p.i. ein und erreicht ab Tag 60 p.i. einen gleichbleibenden Spiegel. *Sarcocystis*-spezifische Antikörper lassen sich erst während der chronischen Sarkozystose nachweisen (ZIELASKO et al., 1981; O'DONOGHUE & WEYRETER, 1982; ZIMMERMANN et al., 1984). Ab Tag 21 p.i. zeigt sich ein steiler IgM-Anstieg mit einem Maximum an Tag 35 p.i. und anschließendem Abfall bis Tag 70 p.i.. Der

Nachweis von IgG gelingt ab Tag 14 p.i.. Der IgG-Spiegel erreicht am Tag 70 p.i. ein Plateau, welches bis zum Tag 154 p.i. konstant bleibt (O'DONOGHUE & WEYRETER, 1984; WEYRETER et al., 1984).

Bei Schweinen der Rasse Meishan wurde ein steiler IgM-Anstieg ab Tag 14 p.i. mit einem Maximum bereits am 21. Tag p.i. und bei Schweinen der Rasse Pietrain ein langsamer Anstieg bereits ab Tag 7 p.i. mit einem Maximum erst am Tag 42 p.i. beschrieben (REINER et al., 2002a). In der gleichen Untersuchung gelang ein Nachweis von IgG bei beiden Rassen erst ab Tag 21 p.i., wobei die IgG-Spiegel bei den Pietrain-Schweinen ab dem 28. Tag p.i. signifikant höher waren als bei den Meishan-Schweinen.

2.3.8 Therapie und Prophylaxe

Es liegen bisher keine Studien über die chemotherapeutische Anwendung beim Schwein gegen *S. miescheriana* vor. Bei anderen Tierarten werden gegen die Sarkozystose einige Kokzidiostatika als wirksam angesehen.

Prophylaktisch sollte vermieden werden, dass Schweine mit Sporocysten in Kontakt kommen. Hunde sollten also von Ställen, Ausläufen und Weiden ferngehalten werden. Auch Futterkontamination stellt eine Infektionsgefahr dar. Sind Ställe erst kontaminiert, ist eine Desinfektion aufgrund der Resistenzlage schwierig. Bei *S. miescheriana* hat sich bisher nur Incicoc als wirksam erwiesen (BARUTZKI et al., 1981). Am Besten wirkt die Hitzebehandlung (Heißdampf, Gasbrenner). Ein kommerziell hergestellter Impfstoff steht zurzeit nicht zur Verfügung (DAUGSCHIES, 2004).

Damit Hunde keine Sporozysten ausscheiden, sollte unbedingt darauf geachtet werden, dass kein rohes Schweinefleisch und Organe an Hunde verfüttert werden. Was Sarkosporidien betrifft, so gilt nur durcherhitztes oder über mindestens 3 Tage tiefgefrorenes Fleisch als nicht infektiös (GESTRICH & HEYDORN, 1974; FAYER, R., 1975; ROMMEL et al., 1979; DUBEY et al., 1989; SALEQUE et al., 1990).

2.3.9 Hinweise auf genetisch bedingte Resistenzunterschiede

Hinsichtlich der Sarkozystose stellten ROMMEL et al. (1981) Empfindlichkeitsunterschiede bei verschiedenen Mauslinien gegenüber *Sarcocystis muris* fest.

Beim Schwein wurden von REINER et al. (2002a) in Infektionsversuchen mit *S. miescheriana* erhebliche Resistenzunterschiede zwischen den Rassen Meishan (ME) und Pietrain (PI) aufgezeigt. Nach Infektion mit 50.000 Sporozysten konnten signifikante Unterschiede in der Rektaltemperatur an den Tagen 42-45 p.i. festgestellt werden. Die Rasse ME zeigte keine Veränderung der Körpertemperatur, bei der Rasse PI stieg die Temperatur hingegen um 0,5 °C. Die Anzahl an Bradyzoiten pro Gramm Muskulatur im Musculus longissimus dorsi (M.l.d.) und im Herzmuskel war bei PI um den Faktor 20 höher als bei ME (REINER et al., 2002a). Pietrain-Schweine hatten auch signifikant höhere CK- (Kreatinkinase) und AST- (Aspartataminotransferase) Werte als Meishan-Schweine. Deutliche Unterschiede zeigten sich außerdem in der Immunantwort. Die IgM-Spiegel erreichten bei ME bereits an Tag 21 p.i. ihr Maximum, bei PI dagegen erst an Tag 42 p.i.. *Sarcocystis*-spezifische IgG-Spiegel waren bei ME ausgeprägter als bei PI. REINER et al. (2002a) vermuteten deshalb einen Zusammenhang zwischen früher Antikörperproduktion und Bradyzoitenbildung in der Muskulatur.

3. Material und Methoden

Der Versuchsablauf (Abb. 7) basiert auf der Erstellung informativer F₂-Familien, die mit *S. miescheriana*-Sporozysten infiziert wurden. Nach einem festgelegten Schema wurden die Tiere klinisch, klinisch-chemisch und hämatologisch untersucht. Am Versuchsende wurden die Tiere euthanasiert und anschließend pathologischen sowie parasitologischen Untersuchungen unterzogen. Mit der Mikrosatellitenanalyse wurden die Genotypen der Versuchstiere erfasst und mittels Kopplungsanalyse genetische Kartierungen vorgenommen. In der QTL-Analyse wurden Phänotypvariationen auf vorhandene Kopplungen mit dem Genotyp hin untersucht. Der QTL-Kartierung folgte die Recherche nach möglichen Kandidatengenen, die der Phänotypvariation zugrunde liegen.

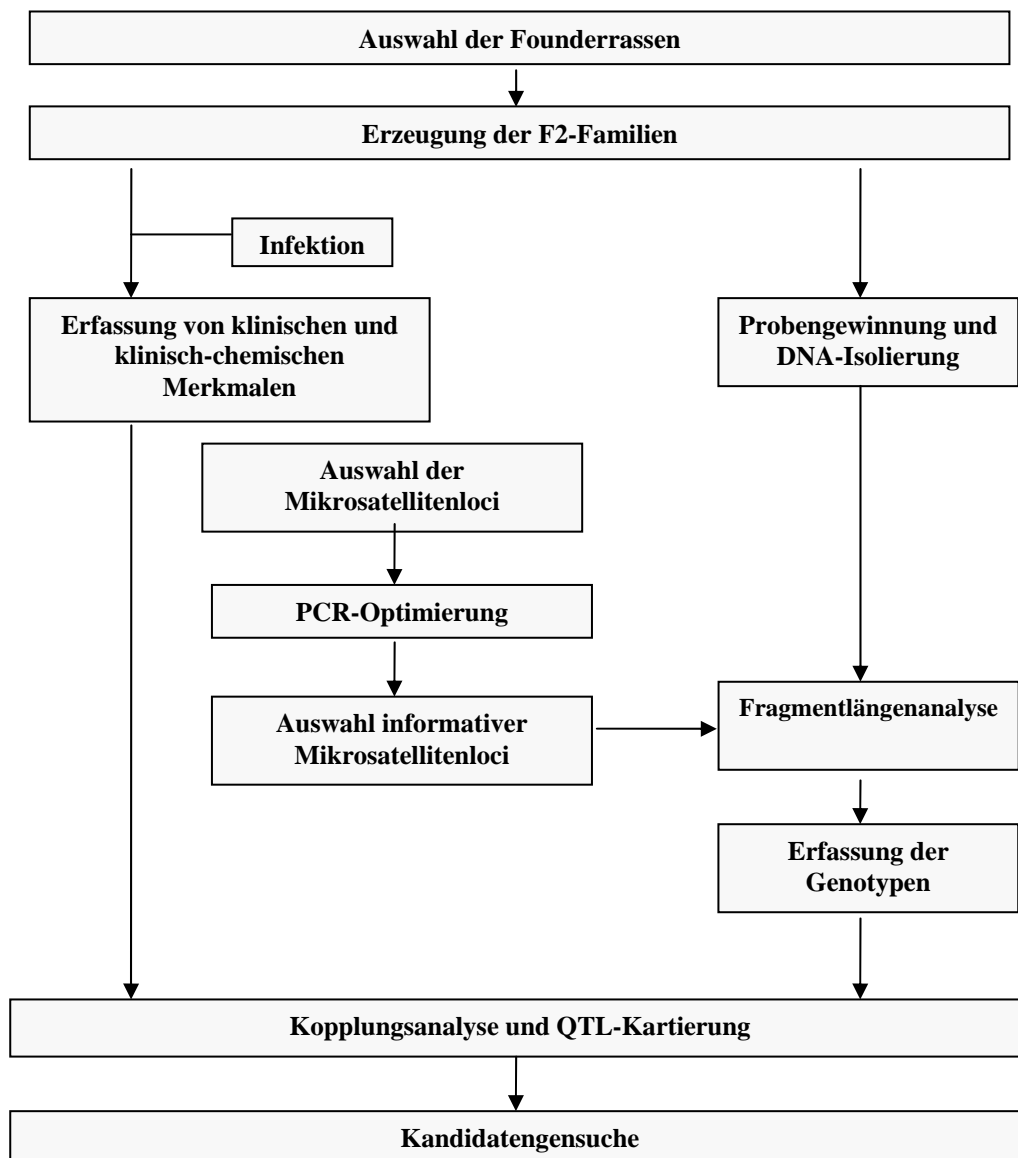


Abbildung 7: Übersicht des Versuchsablaufes

3.1 Versuchstiere / Erzeugung und Behandlung der Tiere

3.1.1 Erzeugung informativer F₂-Familien

Informative F₂-Familien wurden am Institut für Tierzüchtung und Biotechnologie der Universität Hohenheim in Ehingen (AG Geldermann) erstellt. Auf Basis eines Vorversuches (REINER et al., 2002) wurden hierzu die genetisch und phänotypisch divergierenden Ausgangsrassen Meishan (relativ resistent) und Pietrain (relativ empfindlich) verwendet.

Nach der Kreuzung von 4 Pietrain-Ebern mit 4 Meishan-Sauen wurden im nächsten Schritt mit 5 F₁-Ebern und 13 F₁-Sauen 139 F₂-Kreuzungstiere erzeugt (Tab. 1). Die Tiere wurden einheitlich aufgezogen.

Tabelle 1: Erstellung der F₁-Generation

Pietrain-Eber Meishan-Sauen	Zappa	Mumm	Vermont	Mustang
M 684	-	-	PM9♀	-
	-	-	PM54♂	-
M 687	-	-	PM2♀	-
	-	-	PM3♀	-
	-	-	PM5♀	-
	-	-	PM51♂	-
M 689	-	PM18♀	-	-
	-	PM19♀	-	-
	-	PM55♂	-	-
M 690	PM15♀	PM11♀	-	PM21♀
	-	PM12♀	-	PM23♀
	-	PM14♀	-	PM24♀
	-	-	-	PM56♂
	-	-	-	PM57♂

Tabelle 2: Kreuzungsschema der F₁-Generation zur Erstellung der F₂-Generation und Anzahl der F₂-Tiere

Sauen(PM) Eber (PM)	2	3	5	9	11	12	14	15	18	19	21	23	24
51	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	8	5	11	-	10	7	16	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	13	8	14
56	-	-	-	-	-	-	-	-	12	10	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-

Tabelle 3: Aufbau und Umfang der F₂-Familie

Generation	PI x ME	n
Parental	4♂ x 4♀	8
F ₁	5♂ x 13♀	18
F ₂	68♂ / 71♀	139

3.1.2 Haltung der F₂-Kreuzungstiere und Probengewinnung

Nach der Aufzucht an der Universität Hohenheim wurden die Versuchstiere in den Räumlichkeiten der Klinik für Wiederkäuer und Schweine am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eingestellt. Das Verbringen erfolgte in einem Alter von 8-12 Wochen und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 27 kg. Insgesamt entstanden auf diese Weise 21 Tiergruppen. Die Gruppengröße variierte zwischen 5 und 11 Tieren. Die Versuchsdauer pro Gruppe betrug 13 Wochen. Der Tierversuch wurde von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen genehmigt (Aktenzeichen: GI 18/15-Nr.43/2001 vom 17.12.2001)

Die Infektion der Tiere erfolgte 2-3 Wochen nach Einstellung durch orale Verabreichung von 50.000 Sporozysten von *S. miescheriana* je Tier. Die Infektionsstadien wurden am Institut für Parasitologie der Universität Leipzig (AG Dauschies) erstellt (Zitat [s. Genomics]).

Während des Versuches wurden die Tiere regelmäßig klinisch untersucht und dabei die Atemfrequenz, die Herzfrequenz, die Rektaltemperatur und das Allgemeinbefinden dokumentiert. Diese Untersuchungen fanden von Tag 7 vor der Infektion bis zum Tag der Infektion täglich statt. Danach erfolgten sie an den Tagen d7, d12-14, d21, d28, d35, d42, d45, d49, d56 und d63 nach der Infektion. Zur Erfassung der weiteren Merkmale wurden Blutproben an den Versuchstagen d0, d14, d28 und d42 entnommen und im Labor der Klinik für Wiederkäuer und Schweine an der Justus-Liebig-Universität Gießen klinisch-chemisch untersucht. Die Definition hämatologischer Merkmale Thrombozytenzahl und Eosinophilenzahl erfolgte durch Zellzählung im Widerstandsmessprinzip bzw. durch Differentialblutbildbestimmung im nach Pappenheim gefärbten EDTA-Blutausstrich. Die Messung der Serum-Enzyme Aspartat-Amino-Transferase (AST; früher GOT) und Kreatinkinase (CK) erfolgte mittels optimierter Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC) und nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

Die Versuchstiere wurden am Tag 70 post infectionem euthanasiert und anschließend zur Sektion in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht. Dort erfolgten auch die Muskelprobenentnahmen, die für die parasitologischen Untersuchungen am Institut für Parasitologie der Universität Hohenheim (AG Mackenstedt) benötigt wurden. Die Muskelproben wurden dort nach der Methode von JÄKEL (1999) verdaut und die Zystozoen anschließend ausgezählt. Bestimmungen *Sarcozytis*-spezifischer Antikörper (IgG, IgG1, IgG2, IgM) erfolgten ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Mackenstedt an der Universität Hohenheim.

Einzelheiten über den Vorversuchsablauf, in dem die Tiere künstlich mit Sporozysten von *S. miecheriana* infiziert, klinisch überwacht und zur phänotypischen Merkmalerfassung parasitologisch wie hämatologisch untersucht wurden, sind im Detail in der Arbeit von HEPP (2006) dargestellt.

Als Probenmaterial für diesen Versuch diente Sperma von Ebern der Parentalgeneration, sowie Blut von den übrigen Versuchstieren. Die Blutproben der F₂-Kreuzungstiere stammten aus dem Versuch von HEPP. Nach Zentrifugation des EDTA-stabilisierten Vollblutes wurde die DNA aus den Leukozyten des „buffy coats“ extrahiert.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation sowie zweier weiterer noch in Arbeit befindlicher Dissertationsvorhaben.

3.2 Geräte und Labormaterial

3.2.1 Spezialgeräte

- DNA-Sequenzierautomat: LI-COR DNA-Analyser 4200, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA
- Thermocycler: T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen
- Photometer: Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences, Freiburg
- Zentrifugen: Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products, Hanau
Micro Zentrifuge SD 220 Vac, Roth, Karlsruhe
- Pipetten: Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Roth, Karlsruhe
- Wasserbad: Memmert WB14, Firma Memmert, Schwabach
- Vortexer: Heidolph Elektro KG
- Ultraschallgerät: Sonifier Sonoplus HD 200/UW 200, Bandelin
- Autoklav: GE 600/920, Getinge
- pH-Meter: Hanna HI 991000, Hanna Instruments, Portugal
- Magnetrührer beheizbar: Monotherm grau, H+P Labortechnik

3.2.2 Cemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

- Acrylamidlösung. (LongRanger Gel Solution, Cambrex Bio Science, Rockland, USA)
- APS (Ammoniumperoxodisulfat), Roth, Karlsruhe
- Borsäure, Roth, Karlsruhe
- Dextranblau, Fluka Chemie GmbH
- dNTPs, Roth, Karlsruhe
- EDTA, Roth, Karlsruhe
- Ethanol 99,8%, Roth, Karlsruhe
- Formamid deionisiert, Roth, Karlsruhe
- Fuchsin, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Harnstoff, Roth, Karlsruhe
- Hotmaster TaqDNA-Polymerase, Eppendorf, Hamburg
- Isopropanol, Roth, Karlsruhe
- Magnesiumchlorid (MgCl)-Puffer 25mM, Eppendorf, Hamburg
- Mercaptoethenol, Roth, Karlsruhe
- Micro-90 cleaning solution, Sigma-Aldrich (Waschlotion für Glasplatten)
- Natriumchlorid (NaCl), Roth, Karlsruhe
- pBluescript II KS +(Vektor-DNA), Stratagene
- Phenol/Chloroform, Roth, Karlsruhe
- Pipettenspitzen, Roth, Karlsruhe
- Primer, Biomers.net GmbH, Ulm
- Proteinase K, QIAGEN GmbH, Hilden
- Qiagen Multiplex PCR-Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml), Roth, Karlsruhe
- Rotiphorese Gel 40, Roth, Karlsruhe
- Sodiumdodecylsulfat (SDS), Roth, Karlsruhe
- TEMED p.a., Roth, Karlsruhe
- Tris, Roth, Karlsruhe
- TrisHCl, Roth, Karlsruhe
- Triton X100, Roth, Karlsruhe

3.2.3 Lösungen und Puffer

SW-Puffer (DNA-Isolierung aus Sperma):

10 mM Tris

10 mM EDTA pH 8,0

50 mM NaCl

2 % SDS

TE-Puffer (DNA-Isolierung):

100 mM TrisHCl

10 mM EDTA

TBE-Puffer (Sequenzierautomat):

1000 mM Tris

1000 mM Borsäure

20 mM EDTA

Triton X 100 (DNA-Isolierung aus Buffy Coat u. Vollblut):

0,8% Triton X 100

0,9% NaCl

Lysispuffer (DNA-Isolierung):

0,2 M TrisHCl

0,05 M EDTA

1% SDS

Stop-Mix-Solution (Ladepuffer; eigene Herstellung)

12,5 ml Formamid

0,5 ml EDTA 0,5M, pH 8,3

6 mg/ml Fuchsin

3.3 Bearbeitung des Probenmaterials

3.3.1 DNA-Isolierung

Sämtliches zur DNA-Isolierung verwendete Verbrauchsmaterial wurde zuvor autoklaviert. Wenn nötig, wurden abgeschnittene Pipettenspitzen genutzt, um eine Fragmentierung der DNA durch Scherkräfte zu vermeiden.

3.3.1.1 DNA-Isolierung aus „buffy coat“ und Vollblut

EDTA-stabilisiertes Vollblut der F₂-Kreuzungstiere wurde für 12 Minuten (min) mit 1100 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde der Leukozytenanteil („buffy coat“) zwischen Serum und Erythrozytenfraktion in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vorläufigen Konservierung wurden diese Reaktionsgefäße bei -20°C tiefgefroren.

Zur Weiterverarbeitung wurden 500 µl „buffy coat“ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit dem gleichen Volumen Triton X100 vermischt. Nach leichtem Schütteln wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abpipettiert und zu dem verbliebenen Inhalt wurden 500 µl Lysispuffer und 16 µl Proteinase K (Roth, Karlsruhe) zugegeben. Nach mehrmaligem Schütteln wurde die Probe im Wasserbad bei 60°C mit Schüttler für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die Proteine zu entfernen. Dazu wurden 500 µl Phenol-Chloroform auf die Probe gegeben, das Gemisch für 5 min geschüttelt und danach zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, RT). Nun wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert und erneut mit Phenol-Chloroform vermischt, und der Vorgang wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde in das 2,5fache Volumen an eisgekühltem 98%igem Ethanol gegeben und geschwenkt. Nachdem die DNA ausgefallen war, wurde sie mit einer Pipette vorsichtig aufgenommen und in ein neues Gefäß, mit 500 µl 70%igem Ethanol gegeben, danach gemischt und zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT). Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand dekantiert und das Pellet 10-15 min luftgetrocknet bevor es in 100 µl TE-Puffer gelöst wurde. Der Lösungsprozess wurde über Nacht durchgeführt.

Bei der DNA-Isolierung aus Vollblut wurden 0,5 ml EDTA-Vollblut zentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C) und danach der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml Triton X100 gelöst und erneut zentrifugiert (25 min, 3500 rpm, 4°C). Nach Verwerfen des Überstands wurde Lysispuffer entsprechend der DNA-Isolierung aus „buffy coat“ hinzugegeben. Das weitere Vorgehen entsprach der oben beschriebenen Methode.

3.3.1.2 DNA-Isolierung aus Sperma

Zwei ml Spermasuspension aus einer handelsüblichen Besamungsportion wurden abzentrifugiert (3 min, 8000 rpm, RT). Das Pellet wurde in 2 ml SW-Puffer aufgenommen, geschwenkt und erneut zentrifugiert (2 min, 8000 rpm, RT). Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nun wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1400 µl SW-Puffer und 28 µl Mercaptoethanol gegeben. Um die Zellwände zu schädigen, wurde die Probe für 30 s mit Ultraschall behandelt. Danach wurden 60 µl einer 1%igen Proteinase K-Lösung hinzugegeben und über Nacht unter Schütteln bei 55°C inkubiert. Die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte wie unter 3.3.1.1 beschrieben.

3.3.2 DNA-Messung und Qualitätsprüfung

Nachdem sich die DNA vollständig im TE-Puffer gelöst hatte, wurde deren Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt. Hierfür wurde die auf Raumtemperatur erwärmte DNA-Stammlösung 1:20 verdünnt und die optische Dichte bei den Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm gemessen. Auf der Grundlage dieser Werte wurden aus den Stammlösungen Aliquots mit DNA-Konzentrationen von 100 ng/µl hergestellt.

Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten bei 260/280 nm ermittelt. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Werte größer 2,0 wiesen auf einen hohen RNA-Gehalt in der Probe hin. Niedrigere Werte hingegen zeigten Verunreinigungen mit Phenol oder Proteinen an. Ein weiterer Qualitätsparameter war die optische Dichte bei 320 nm. Eine Absorption größer Null deutet auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen hin. Alle Proben, die den Qualitätskriterien nicht entsprachen, wurden neu aufgearbeitet und aufgereinigt.

3.4 Auswahl der Mikrosatellitenloci und Primer

Die Mikrosatellitenloci wurden so ausgesucht, dass ein mittlerer Abstand im Genom von 25-30 cM entstand. Ein weiteres Auswahlkriterium war ihre Informativität. Bei der Auswahl flossen Ergebnisse der „genomweiten QTL-Kartierung von Merkmalen der Empfindlichkeit gegenüber dem Pseudorabiesvirus beim Schwein“ ein (MELCHINGER, 2002), die ebenfalls an einer Pietrain/Meishan-Familie durchgeführt wurde.

Für Mikrosatelliten aus dieser Arbeit, die in vorliegender Familie nicht informativ waren, wurden weitere Mikrosatelliten aus der USDA-Liste des US-Meat-Animal-Research-Center hinzugenommen. Weitere zusätzliche Mikrosatelliten wurden aufgrund ihrer Nähe zu bekannten Kandidatengenomen ausgewählt.

Alle Primer (Tab. 4) wurden von der Firma Biomers synthetisiert. Die Forward-Primer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff DY-781 markiert. Primer, die als Lyophilisat vorlagen, wurden in TE-Puffer gelöst. Die Stammlösungen wurden später nochmals mit sterilem Wasser zur Gebrauchslösung verdünnt.

Ein Drittel der in Tabelle 4 aufgelisteten Mikrosatelliten wurde im Rahmen dieser Dissertation etabliert und analysiert. Die Etablierung und Genotypisierung der übrigen Mikrosatelliten erfolgte im Rahmen der Dissertationen von FISCHER (in Vorbereitung) und KÖHLER (in Vorbereitung).

Tabelle 4: Liste der Mikrosatelliten und deren Primersequenzen (5'→3'; oben: Forward Primer; unten: Reverse Primer) und Informationen über: SSC, Chromosomennummer; AT, Annealingtemperatur; Verd., Verdünnungsstufe des Amplifikats zur Verwendung im Sequenzierautomaten; Pol., Polymerase (Ep: Eppendorf; MM: Qiagen-Multiplex); Multiplex, als Multiplex-PCR mit den aufgeführten Mikrosatelliten amplifiziert.

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
1	Sw552	AAGAGCCAGATGGGGAGG	Rohrer et al. 1994	55	24	1/3	Ep	-
		ACTGATAAGACATGCTGTGTGC						
	SW1332	GCATATGCTGCAGGTACGG	Rohrer et al. 1996	63	24	1/14	MM	SW1056
		CAGCCTAAGCCAAGTATGTGG						
	S0008	GAGGCAGTGTGTTCTATTCA	Fredholm et al. 1993	55	25	1/16	MM	-
		GCCATGTGTAAAGTGTGTGCT						
	Sw1123	GAGTCTGCCTGCATTGTGAA	Rohrer et al. 1994	62	25	1/10	MM	SW1101
		TCTGTCTTTGTTTCTGTCTGTCTT						
	Sw780	TCTACCAGCTAAATGCTCACTG	Rohrer et al. 1994	58	27	1/9	Ep	-
		TAGGACCTGGAATATACTCCCTG						
	SW803	GGTCACAATTGAGGGCACTC	Rohrer et al. 1994	60	25	1/15	MM	SW2443 SW349
		TCCCAAGCAACAGAAGTGC						
	Sw705	CTGAAGTCTTGAGATGAAACGC	Rohrer et al. 1994	58	27	1/7	Ep	-
		TGTAGAGCATTTAGAGGAAGC						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
2	SW2443	GAGCACAGAAGATTTTtagggc	Alexander et al. 1996b	60	25	1/15	MM	SW803 SW349
		TTAGTTTCTCCTGGGCTGTG						
	Sw1650	CAATTTCTGCTGAACAGCATAG	Rohrer et al. 1996	52	25	1/6	Ep	-
		GGGTATAAAATTCTTGGGAAGG						
	SW240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW491 SW835
		AAACCATTAAAGTCCCTAGCAAA						
	S0091	TCTACTCCAGGAGATAAGCCAGAT	Fredholm et al. 1993	57	23	1/6	MM	-
		CAGTGACTCCATGCACAGTTATGA						
	SW834	GTGAGGGATGGACAGGTCAT	Rohrer et al. 1996	60	25	1/14	MM	SW1434
		AAAAAATCCACCCTCAACACA						
	Sw395	TTCCAAGGTTATGGAGATATCC	Rohrer et al. 1994	59	25	1/3	Ep	-
		GATCCCTACCTCACACCACA						
3	Swr2157	ATCAGTACTTTTAGCAATGATAGCC	Rohrer et al. 1996	52	24	1/9	Ep	-
		AAAGAGACTTAAGGTTCCCCAG						
	Swr345	AACAGCTCCGATTCAACCC	Rohrer et al. 1994	62	25	1/3	Ep	-
		TACTCAGCCTTAAAGGAAGGG						
	SWR308	TCCAGTCCCTTGGTCTCTTG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW581
		TTAGCCTGGGAACCTCCATG						
	S0036	AGTGACGTGAGGGTCTGCTCCTC	Brown et al. 1994	60	27	1/7	MM	SW413 SW903
		ATGGACGGTGGATTACAGCC						
	Sw72	ATCAGAACAGTGCGCCGT	Rohrer et al. 1994	56	27	1/7	Ep	-
		TTTGAAATGGGGTGTTTCC						
	S0206	TGGGTGTGGTCAACAACCAA	Robic et al. 1995	60	24	1/12	MM	SW938 SW2425
		ACGTGCCTGCCTCTACCATC						
4	Swr978	CCCGGTGATGTCAAGTGAC	Rohrer et al. 1994	63	25	1/3	Ep	-
		CATATGCCGAAGTGCAG						
	Sw2570	TGGGGCTGAGTTATCCAGAG	Alexander et al. 1996	50	25	1/9	MM	SW2410
		TCTCTAGCCCTGTCACTCACTC						
	SW314	CCTCCTTGAGCCTACCCTTC	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW911 S0005
		CCCTAGCCCTGGAACCTCTG						
	Sw1327	AGCTCTGAAGCTCAAAGACG	Alexander et al. 1996	55	24	1/10	MM	S0001
		CATACTTCTCCAGGAGGAAAGC						
	SW349	CCTGTTGTAGGCTCCATGAG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/15	MM	SW803 SW2443
		CTAGGAGTCGGCCCTGAAC						
4	Sw489	CAAGTGTGAAATTTGTGCGG	Rohrer et al. 1994	52	26	1/10	MM	S0025
		CGAAGTGCTAACTATAAGCAGCA						
	SW835	TGGCTCAGAGTTTTCACTCTG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW240 SW491
		CAGAGGTTTACCAAGTTTGGC						
	S0001	TGGATGGGTCTCATTCTCAG	Fredholm et al. 1993	55	24	1/10	MM	SW1327
		TGATTCTAGCTGAGAAGC						
	S0073	ACTGAAACAGGAATTCAGATCC	Fredholm et al. 1993	60	24	1/12	MM	SW2428
		TGAAGTATTATGGCATCATGGA						
	Sw2435	CAAAGCAGATGCACAGTTTAGG	Rohrer et al. 1996	53	23	1/10	MM	SW1848
		CAGAGGGTTGTTGGTGGG						
	Sw856	AGGGGTGGGTGATTGTG	Rohrer et al. 1996	53	24	1/12	MM	SW2480
		AACTCCCCATGCTGCTG						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
5	Sw413	CAGACACACACCCAGTGTC	Rohrer et al. 1994	60	27	1/7	MM	S0036 SW903
		AGGTCCAACCCTCCTGATG						
	ACO	ACAGCAAAGTGACCCAGCC	-	59	24	1/18	MM	IL1 S0018
		GTGAGAAATTGAAGTAGTCCC						
	SW491	TTTAAGCCACTGCACCAGG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW240 SW835
		CAGGGAACTCCTCATAGTCCC						
	SW1482	ATTGCAGACTACAGTTCTTGCC	Alexander et al. 1996	60	25	1/12	MM	SW2431
		ACTTACGGGCTGATGCTGTC						
	SWR453	TTGAATTTTTTTCATGGAAACC	Rohrer et al. 1994	59	24	1/9	MM	-
		TCTGGACTTGCTGTGACTGTG						
	S0092	GGGAAACACTAAATCACTTGCCAT	Fredholm et al. 1993	60	23	1/7	MM	-
		GGGATCAAGACTTCACACTCCCAT						
6	SW2425	ATCTCCATAGGTCAGAGGCTC	Alexander et al. 1996	60	24	1/12	MM	SW938 S0206
		ACTCTGTGAGACATTCCTGTATTCC						
	IFNG	ATTAGACCCTAGCCTGGGA	Rohrer et al. 1994	60	25	1/7	MM	APOA1 SW225
		GTTGGTCTGTTCTCCAATAGG						
	S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	Fredholm et al. 1993	60	25	1/14	MM	SW314 SW911
		GCATTCTGTGATTCTGGGTA						
	S0018	GCACAGTTGATGCTTCATGC	Coppieters et al. 1993	59	24	1/18	MM	IL1 ACO
		GATCAAAAGTCCCCAATTCC						
	Sw378	ATTATGCACCCCTACTCCCC	Rohrer et al. 1994	57	24	1/10	MM	SW2083 SW742
		GATTTCCTCTTGTGTGTGCC						
7	S0035	GGCCGTCTTATACTCTCAGCATA	Brown et al. 1995	60	25	1/14	MM	SWC23 SW2515
		CCAAATAAACAGCAGGCAGCCT						
	Sw1329	GATCTCTCTGTCTTATCTACACAC	Alexander et al. 1996	50	24	1/12	MM	SW2160
		AACCTCGTCCTTTCTTAGCC						
	SW1057	TCCCCTGTTGTACAGATTGATG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/10	MM	SW322
		TCCAATTCCAAGTTCCTACTAGC						
	S0087	GACAAGCTCCAGGAAGCTTTCCTG	Ellegren et al. 1993	62	24	1/7	MM	SW2093
		ATTGCCCTGTGATCCCAAGGGGCA						
	Sw492	TCCATCAGCTCACATAGTTAGC	Rohrer et al. 1994	54	25	1/13	MM	S0064
		ACCATGACAGGAACTCCGAG						
	Sw824	CTAAACTTTGAATGTCTTGCCTG	Rohrer et al. 1994	55	24	1/12	MM	SW790
		ACCAAAGCCTCGTTTCAAGA						
7	SW322	CATTCAACCTGGAATCTGGG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/10	MM	SW1057
		TCCCTGGAAAGGCTACACC						
	Sw2052	ACTCACTGTTTCCGGAGGC	Alexander et al. 1996	55	28	1/10	Ep	-
		CCCCTGTGCATACATAGTTGC						
	S0025	TCTCCCTTCCCTCCATCTCT	Coppieters et al. 1993	52	26	1/10	MM	SW489
		CTCCATCAGCCAAAAACATT						
	S0064	TGAGCTGGAGGTTAGCTACC	Fredholm et al. 1993	54	25	1/13	MM	SW492
		TGTCAGAAAGACTGCTTGCG						
	LTA	CTGGTCAGCCACCAAGATT	Chardon et al. 1991	60	24	1/10	MM	-
		GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC						
	Sw2428	AGGTCTTGGGAGGTGTGTG	Smith et al. 1995	60	24	1/12	MM	S0073
		TTATGAATGGGATATTGTCGTG						
	Sw1083	CCTTGCTGGCCTCCTAAC	Rohrer et al. 1994	56	25	1/4	Ep	-
		CATACTCCAAAATTCTATGTTGA						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
7	SW581	CCCCAGATTGACTCTAGACTCG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW308
		CATGATGGAGGATAATGTGGG						
	S0212	CCACGACTCAAACCTTAG	Robic et al. 1994	51	25	1/3	Ep	-
		TCITTCTTAGAATATCTCACAT						
	Sw764	TAGCAGATTGTTAGCCTCTGTG	Rohrer et al. 1994	57	25	1/12	MM	SW344
		AAGCATCTTTTCTAAGCACAACA						

8	Sw2410	ATTGCCCCCAAGGTATTTTC	Alexander et al. 1996	50	25	1/9	MM	SW2570
		CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG						
	Swr1101	AACTTCCATATGCCACAGGTG	Rohrer et al. 1994	62	25	1/10	MM	SW1123
		GGTCCTCCTCAGAAAGTCCC						
	Sw1953	TATCAAATCGTGTCCAGCC	Alexander et al. 1996	60	24	1/14	MM	SW1041 SW2519
		GAACCTGCTGTGTCTACAGCC						
	Sw2160	TCTGCTTTTTTCCCCTG	Alexander et al. 1996	50	24	1/12	MM	SW1329
		TTTCTCAGCAATCTGATTGGG						
	Sw790	CTGTGGGAGTGTAGCATCTTG	Rohrer et al. 1994	55	24	1/12	MM	SW824
		CATACACCCAGATGTGGC						
	Sw1980	GCTTCTGTATGCCACAGCTG	Alexander et al. 1996	57	30	1/11	Ep	-
		CCCCATTGAACAATGAAG						

9	Sw983	GCAGTCCCACTCTTAGGTATATATCC	Rohrer et al. 1994	62	25	1/10	MM	SW1897
		ATAATGCTGCTATGAACACTGTAGTG						
	SW21	CGATTTTAATGTGCAGCCG	Alexander et al. 1996	60	25	1/8	MM	SW497
		CAGGAGCTGACCTATCTGGTG						
	S0024	AAAGAAGGAAAGAACTGATA	Coppieters et al. 1993	50	25	1/10	MM	SW2043
		ATGGAGGATAATGTGAAAAA						
	Sw911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC	Rohrer et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW314 S0005
		CATCTGTGGAAAAAAAAGCC						
	Swr1848	AAGGGGAAAATCCCTCAAAG	Alexander et al. 1996	53	23	1/10	MM	SW2435
		TTTCTATGCAAATTTTCCGTG						
	Sw2074	ATGTGATTATCATTGTCTGTAGCC	Alexander et al. 1996	52	25	1/7	Ep	-
		ATCCAGATTATGAGACACTTACCC						
	APOA1	CAGCTCCTCGGTCTATCTGG	Rohrer et al. 1996	60	25	1/7	MM	SW225 IFNG
		TCTCTCCATCATTGTGCAGC						
	SW1434	ATCGCTTAAATCTGGTGACATG	Alexander et al. 1996	60	25	1/11	MM	SW834
		AAGTCTCATCAGCACATTGAG						
	Sw2093	ATGCACCTGCTCAGAGGC	Alexander et al. 1996	62	24	1/7	MM	S0087
		GTCTGTTGAGGCCATGGG						
	Sw749	TTCCCAAACCAACCAAGAG	Rohrer et al. 1994	60	24	1/12	MM	SW761
		AGGAACTTGCCAAAATCACG						

10	Sw767	TGCGTGACTAGAACCCTGTG	Rohrer et al. 1994	62	28	1/10	Ep	-
		TCACGCAGAACGTTTCAGAC						
	Sw497	TTAGGAACGTCTGGGTTTGG	Rohrer et al. 1994	60	25	1/8	MM	SW21
		TGGGAGCTTCCATGTGTTG						
	Sw1041	ATCAGAAAATGGTCAACAGTTCA	Rohrer et al. 1994	60	24	1/14	MM	SW1953 SW2519
		GGAGAATTCCCAAAGTTAATAGG						
	Sw2043	CATATTGGGATAAATCATTTCATCA	Alexander et al. 1996	50	25	1/10	MM	S0024
		GGTTTTAAATTGGCAAGCCA						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
10	Sw1708	TCAATTCAACCCCTAGCCTG	Alexander et al. 1996	65	25	1/9	MM	-
		TTCAAGCACTGACCTCTGTCC						
	Sw2067	GAAGAAATTAAATGCACGTCCC	Rohrer et al. 1996	52	25	1/9	MM	SW949
		TTGCTGCTGTGCCTTTG						
11	S0385	CTATTAGGCTGGAGGGTTG	Riquet et al. 1995	55	25	1/3	Ep	-
		AGTTCAGAAGCTGTGCT						
	S0182	CTCCATATGCCACGGAAAT	Ellegren et al. 1995	52	26	1/8	Ep	-
		CAGTCTTCTCCAGACATAAA						
	Sw903	TTTCTTTGACAGTTGTGCAAGG	Rohrer et al. 1994	60	27	1/7	MM	SW413 S0036
		TGAACTACAGCAGCGACCTG						
12	S0143	ACTCACAGCTTGTCTGGGTGT	Wilke et al. 1994	62	24	1/7	Ep	-
		CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC						
	Sw957	AGGAAGTGAGCTCAGAAAGTGC	Rohrer et al. 1994	55	24	1/6	Ep	-
		ATGGACAAGCTTGGTTTTCC						
	Sw943	AGGAGGACTAGAGCGCCTG	Rohrer et al. 1994	55	25	1/3	Ep	-
		AGAGAGGCCAAGAATAGAACCC						
	SW874	AAAAGAACCCAACTACAGCAGC	Rohrer et al. 1994	60	24	1/14	MM	SW419
		TTTATGAGGGTATCCTGACACC						
	S0090	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA	Fredholm et al. 1993	55	24	1/7	Ep	-
		GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG						
	SWC23	TACCCCTCAGAGTGACCAG	Alexander et al. 1996	60	25	1/14	MM	S0035 SW2515
		CAAAGGAGCATGTTTATGGATG						
	ALOX12	CTTCAATGGTGCAGTGGGTG	Ellegren et al. 1993	50	24	1/6	Ep	-
		ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG						
	Swr1021	CGCCACAAGTGAACCTCC	Rohrer et al. 1994	52	27	1/4	Ep	-
		CCGCGGGTCCAGCTATAG						
13	S0219	CCGCCAATGCCATTCCAA	Robic et al. 1994	50	24	1/7	Ep	-
		CACATCGGTAGTGTTTACATTGAT						
	Sw344	AGCTTCGTGTGTGCAGGAG	Rohrer et al. 1994	57	25	1/12	MM	SW764
		GTAGTGGTCCAAAGAGAGTGCC						
	Sw225	AGGACCCACCAAGAGTTACC	Rohrer et al. 1994	60	25	1/7	MM	APOA1 IFNG
		TGCTGGTAATGGGTGATTAGG						
	SW1056	GGTGGTTGGTTCTCAAAAACA	Alexander et al. 1996	63	24	1/14	MM	SW1332
		TTTCTGGTGTACAGCAAAGTGA						
	Sw38	ACGTCTGTGTCCGTGCCT	Rohrer et al. 1994	55	22	1/8	MM	-
		GAGGCTCCTGATAGCAGCC						
	SW2440	CTGGTGTGAAACCCAATCG	Alexander et al. 1996	57	24	1/11	MM	-
		CCCCATAAGGACAGCAATC						
	S0215	TAGGCTCAGACCCTGTGCAT	Robic et al. 1994	58	27	1/11	Ep	-
		TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT						
14	Sw2038	GCCGAGAAACCCTTCACC	Alexander et al. 1996	60	24	1/13	MM	SW787
		TAGCCTGTTCAGTGCCACC						
	Sw2519	CGTCTCCCACTAGGCTTTG	Alexander et al. 1996	60	24	1/14	MM	SW1041 SW1953
		GGATACTAAGTGTCTCCCCC						
	Sw761	CTTGTCTCCCATTAAGCTG	Rohrer et al. 1994	60	24	1/12	MM	SW749
		TCTAGCAAATGTCTGAGATGCC						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
14	SW2515	CCATCTCATCCAGAAACATCC	Alexander et al. 1996b	60	25	1/14	MM	S0035 SWC23
		AGGATGCTGAGGTGTTAGGC						
15	Sw1204	ATTTTGAACATGAGTAATTCCTG	Rohrer et al. 1994	55	24	1/9	Ep	-
		TGATGCTCTTGTCTTCTGTATGTG						
	SW938	TTATTATTCCATTGCCATTGG	Rohrer et al. 1994	60	24	1/12	MM	SW2425 S0206
		CACTTATGATGGAACATGATGG						
	S0148	TGGTGTAGGCCTGCAGTTGA	Wilke et al. 1994	60	24	1/12	MM	SW1031
		CCATCCATTGCTACTGGCAC						
	S0118	TGAACCTTATATGTACATGTATGC	Groenen et al. 1995	50	24	1/4	Ep	-
		CCTTTATTACAGACCACAATGGG						
	Sw2083	AAATTTGTGAGTTTGTGTGGG	Alexander et al. 1996b	57	24	1/10	MM	SW378 SW742
		ACACCTGAGAGTGTGTCTGTAGC						
	SW1983	GCAGGTTTCGGCCTTAAAG	Alexander et al. 1996	60	25	1/14	MM	CH13
		CCACATAGCTCCCTGCTACC						
	Sw1339	CCTCTGCAGAGACCTGTGC	Alexander et al. 1996	50	24	1/3	Ep	-
		AGGAAGAGAGCCGCCTTG						
16	Sw742	AATTCTACTTCTGGGGAGAGGG	Rohrer et al. 1994	57	24	1/10	MM	SW378 SW2083
		CTTTTGGAACATTTCTGCC						
	SW419	AATGGGAAATAGGCTCTAAGCC	Rohrer et al. 1994	60	24	1/14	MM	SW874
		TCCCCTCCCTATACATGTGC						
	Sw1809	AGGTAGCATCCCTAGTTTTTGG	Alexander et al. 1996	58	25	1/10	MM	SW1920
		CCCACATCAAGCCTTAGCC						
	Swr2480	TTGAGGAACTGCCCTACTGG	Alexander et al. 1996	53	24	1/12	MM	SW856
		ACTGGTTATGGAGCATGATGG						
	Sw1897	GTGCCGTGGCAGGAATC	Alexander et al. 1996	62	25	1/10	MM	SW983
		ACTGCCATTTGTTTCAAAGTG						
17	Sw335	GAGTATGGGGAAAGCCACG	Rohrer et al. 1994	52	25	1/10	MM	S0296
		CCATCAACAACTGTATGCACC						
	S0296	TGAAAAATAACAAGAACCAC	Hoyheim et al. 1994	52	25	1/10	MM	SW335
		AAAAGCAAATAATGATAATAG						
	Sw1920	GATCCGTATCTATAGCCACCTG	Alexander et al. 1996	58	25	1/10	MM	SW1809
		ATGAAAGCTACCAACCCCTCC						
	CH13	TTGGCATCCTTGTTGAAACC	Davies et al. 1994	60	25	1/14	MM	SW1983
		TTCATATGCTGCAGGTGTGGC						
	SW1031	ATCACCCAGACAAAACAATCTC	Rohrer et al. 1994	60	24	1/12	MM	S0148
		TATGTCAACCCCAAACCC						
	SW2431	CTTCCCAGGATGTTGTCTAAAC	Alexander et al. 1996	60	25	1/12	MM	SW1482
		CATGGTGCACACTTAGTGGG						
	SW2427	GCATGTTATTGAGTTGATGTGTAGG	Alexander et al. 1996	58	25	1/8	MM	S0120
		TCGGAATTCCAGAAAATTGG						
18	Sw1808	CCAAAAAGTGGACTGTAAGCC	Alexander et al. 1996	50	25	1/10	MM	-
		TACGGATGGATGGAGACAGG						
	Sw787	CTGGAGCAGGAGAAAGTAAGTTC	Rohrer et al. 1994	60	24	1/13	MM	SW2038
		GGACAGTTACAGACAGAAGAAGG						
	S0120	GCCTAAGTAGAATTAAGCACAAGG	Groenen et al. 1995	58	25	1/10	MM	SW2427
		GTGCTCTCACTGCCTTCATATACC						

Tabelle 4 (Fortsetzung):

SSC	Markername	Sequenz	Referenz	AT	Zyklen	Verd.	Pol.	Multiplex
X	Sw949	TGAGCAATGAGTTCAATGCC	Rohrer et al. 1994	57	25	1/9	MM	SW2043
		TCGTTGGTGAAGGCATCC						
	Sw2126	CCTAAATGTCCATCTATAAATGAATGAC	Rohrer et al. 1996	60	24	1/10	MM	-
		CATTATTTTGTCCCTTTTAATAGCTGAG						
	S0117	CAGGAAGCTGAAGCTGAGATTGA	Groenen et al. 1995	58	24	1/10	MM	-
		CTGTCAGGGAGCTAGTTTCACTCA						
	Sw1608	CTAATGTTGACTTGATTAATGGGC	Alexander et al. 1996	58	24	1/10	MM	-
		TGAAGCTTCTACTTAAGGAAGAATC						
	Sw2588f	TGCTTCTTCCCCCTCCC	Rohrer et al. 1996	60	24	1/10	MM	-
		AAAGCCTGGTGAGGACCC						

3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zuerst wurde für jedes Primerpaar eine PCR-Optimierung durchgeführt. Hierzu wurde im Temperatur-Gradienten die optimale Annealingtemperatur für jedes Primerpaar bestimmt. Auch die Zyklenanzahl wurde angepasst. Um Unspezifitäten zu minimieren, wurde ausschließlich mit Hot-Start-Polymerase gearbeitet. Die entstandenen Amplifikate wurden während der Optimierungsphase zur Prüfung im Sequenzierautomat aufgetrennt und beurteilt.

Nach Abschluß der Optimierungsphase wurden die Mikrosatelliten der Reihe nach und chromosomenweise abgearbeitet. Zur Bewältigung der großen Probenmengen wurden möglichst viele Mikrosatelliten als Multiplex-PCR dargestellt. Hierdurch wurde es möglich bis zu drei Primerpaare in einem Reaktionsansatz (Tab. 6) zu verwenden. Die Multiplex-PCR wurde in den Fällen angewandt, in denen die Annealingtemperaturen der Primerpaare möglichst identisch und die Größe der Amplifikate möglichst unterschiedlich waren. Die übrigen Mikrosatelliten, die einzeln dargestellt werden mussten, wurden mit dem in Tabelle 5 dargestellten Reaktionsansatz bearbeitet. Die PCR-Bedingungen sind entsprechend Tabelle 7 und Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz (Hot Start Polymerase, Eppendorf)

Substanz	Menge [μ l]
Hot Start Polymerase (5 U/ μ l)	0,04
Puffer	1
dNTP-Mix (20mM)	0,2
Wasser	6,16
Primermix (3,2 μ M Endkonz. pro Primer)	1,6
DNA	1
Gesamtvolumen	10

Tabelle 6: Multiplex-PCR-Reaktionsansatz (Qiagen Multiplex PCR-Kit)

Substanz	Menge [μ l]
2x Multiplex Mastermix	5
Primermix (2-3 Primerpaare; je Primer 0,5 μ M; H ₂ O)	4
Wasser	im Primermix enthalten
DNA	1
Gesamtvolumen	10

Tabelle 7: Programm: PCR Eppendorf-Hot-Start-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	94	2 min	Denaturierung und Taq aktivierung	1 x
2	94	20 s	Denaturierung	27 x siehe Tab. X
3	variabel	10 s	Annealing	
4	65	30 s	Extension	
5	65	5 min	Final Extension	1 x

Tabelle 8: Programm: Multiplex-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq aktivierung	1 x
2	94	30 s	Denaturierung	22-30x siehe Tab.X
3	variabel	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x

3.6 Fragmentlängenanalyse

Die Fragentlängenanalyse wurde mit dem DNA-Sequenzierautomaten durchgeführt.

3.6.1 Längenstandard

Die Herstellung des Längenstandards erfolgte in eigener Regie. Der kürzeste Längenstandard sollte kürzer als das kleinste Mikrosatellitenamplifikat sein. Entsprechendes galt für den größten Längenstandard. Im dazwischen liegenden Längenbereich wurden drei weitere Amplifikate angestrebt. Als Grundlage diente eine Vektor-DNA (pBluescript II KS +), aus der mittels der definierten Primer MS, MS71, MS141, MS180, MS225 und MS281 (Firma Biomers) (Tab. 9) die erwünschten Amplifikatlängen hervorgehen sollten. Die reversen Primer waren am 5`Ende mit dem Farbstoff DY-781 markiert.

Der PCR-Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR sowie das entsprechende PCR-Programm sind in Tabelle 10 bzw. in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 9: Namen und Sequenzen der zur Längenstandardherstellung genutzten Primer

Primernamen	Sequenz 5'-3'
MS (forward)	GTG TAA AGC CTG GGG TGC
MS71 (reverse)	GGA AAG CGG GCA GTG AG
MS141 (reverse)	ATA CGC AAA CCG CCT CTC
MS180 (reverse)	CGC AGC GAG TCA GTG AGC
MS225 (reverse)	GCC TTT GAG TGA GCT GAT ACC
MS281 (reverse)	TTG CTC ACA TGT TCT TTC CTG

Tabelle 10: Multiplex-PCR-Ansatz zur Herstellung des Längenstandards

Substanz	Menge [µl]
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
Primermix (reverse Primer MS71, MS141, MS180, MS225; MS281; forward Primer MS (markiert DY-781))	10
DNA (10 ⁶ Moleküle/µl; pBluescript II KS)	2,5
Gesamtvolumen	25

Tabelle 11: Programm: Längenstandard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq aktivierung	1 x
2	94	30 s	Denaturierung	30 x
3	58	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x

3.6.2 Herstellung der Gele

Zur Herstellung der Gele wurden Abstandhalter (Spacer) (Dicke 0,25 mm, FA. LI-COR) zwischen die Glasplatten (41 cm Länge, Fa. LI-COR) gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und leicht schräg gestellt. Zu der Acrylamidlösung wurden 400 µl 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 40 µl TEMED gegeben, leicht geschwenkt und die Lösung zwischen die Glasplatten pipettiert. Die Apparatur wurde plan aufgelegt und das Gel für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert.

3.6.3 Probenvorbereitung und –auftragung

Zuerst wurden die PCR-Produkte mit einem eigens hergestellten Stop-Mix verdünnt und anschließend im Wasserbad für 3 Minuten bei 92°C denaturiert. Die Verdünnungen mussten je nach PCR-Programm variiert werden, damit exakt abgegrenzte Banden entstanden. Um auswertbare Verdünnungsstufen zu ermitteln, wurden die PCR-Produkte der Parental- und der F1-Generation in den Verdünnungen 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 aufgetragen. Die deutlichsten Bandenmuster wurden in der Verdünnung 1:16 erzielt. Das Probenauftragsvolumen pro Geltasche variierte zwischen 0,6 und 1,0 µl. Für das Gel wurde ein Haifischkamm mit 48 Taschen verwendet.

3.6.4 Elektrophoresebedingungen

Zuerst wurden die Platten mit dem polymerisierten Gel in den Sequenzierautomaten eingehängt und der obere und untere Puffertank mit insgesamt 1000 ml TBE-Puffer befüllt. Die Elektrophoresebedingungen konnten über die zum Sequenzierautomaten gehörige Software gesteuert und überwacht werden. Um die Gele für den eigentlichen Lauf vorzubereiten, wurde jeweils ein Vorlauf (Pre-Run) unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben und die Längenstandards in die Geltaschen eingefüllt und der Lauf (Run) gestartet (Tab. 13). Die Gele wurden maximal dreimal wieder verwendet. Bei optimalen Elektrophoresebedingungen konnten nach 90 Minuten Fragmentlängen von bis zu 285 Basenpaaren (bp) nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Pre-Run-Bedingungen

Spannung	1500 V
Stromstärke	40 mA
Leistung	40 W
Zeit	15 min

Tabelle 13: Run-Bedingungen

Spannung	1500 V
Stromstärke	40 mA
Leistung	40 W
Zeit	45-100 min
Temperatur	50 °C

3.6.5 Auswertung der Fragmentlängenanalyse

Die Daten der Fragmentlängenanalyse im Sequenzierautomaten wurden durch die mitgelieferte Software (LI-COR e-seq Release 2.0, LI-COR Inc, Lincol, USA) gespeichert und zur Bearbeitung mit dem Programm 1DScanEx for Windows Version 3.0.1 (Scanalytics Inc., Fairfax NA, USA) aufgerufen und in ein lesbares Format konvertiert (Abb. 8). Schwankungen in der Intensität der Banden konnten durch Herauf- oder Herabsetzen der Empfindlichkeit in der optischen Darstellung gut ausgeglichen werden. Bei zu starken oder zu schwachen Banden wurde der Lauf mit einer anderen Verdünnungsstufe des PCR-Produktes wiederholt.

Aus dem Übersichtsbild (Abb. 8) heraus wurde jede einzelne Probenspur für sich analysiert, indem die unterschiedlichen Intensitäten der Banden als Peaks dargestellt wurden (Abb. 10). Jeder einzelne Peak wurde auf Plausibilität überprüft. Hierzu wurden zunächst die PCR-Amplifikate der Großeltern- und Elterntiere neben den PCR-Amplifikaten der F₂-Tiere aufgetragen. Dadurch konnten die Fragmente der Nachkommen mit Hilfe eines Familienstammbaums eindeutig zugeordnet werden, auch wenn das Programm geringgradig unterschiedliche Fragmentlängen errechnete. Die Berechnung der Fragmentlängen der einzelnen Allele erfolgte auf der Basis der externen Längenstandards (Abb. 9).

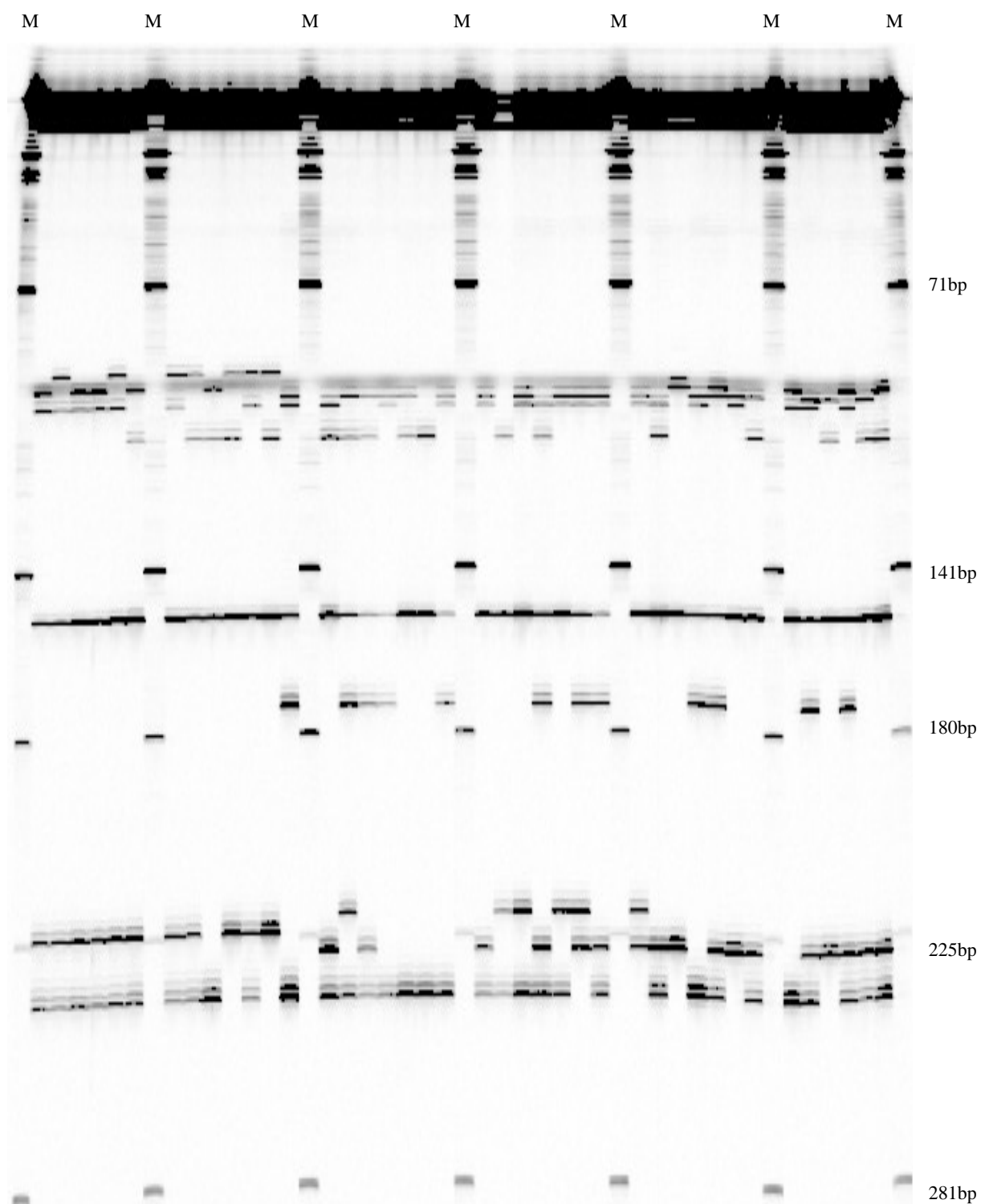


Abbildung 8: Darstellung eines Gelbildes mit der 1DScanEx-Software; M: Längenstandard; rechts: Größe der Längenstandardamplifikate in Basenparen (bp)

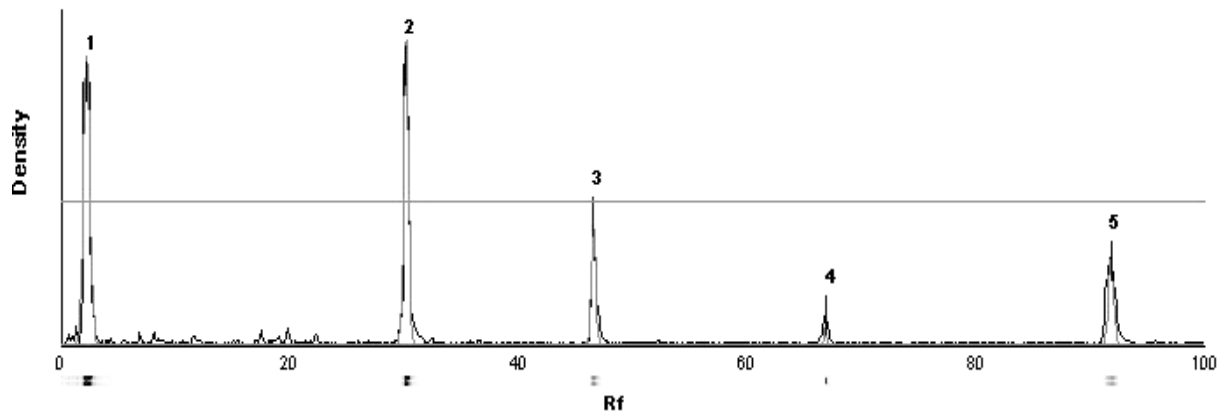


Abbildung 9: 1DScanEx-Darstellung des Längenstandards (1=71bp; 2=141bp; 3=180bp; 4=225bp; 5=281bp)

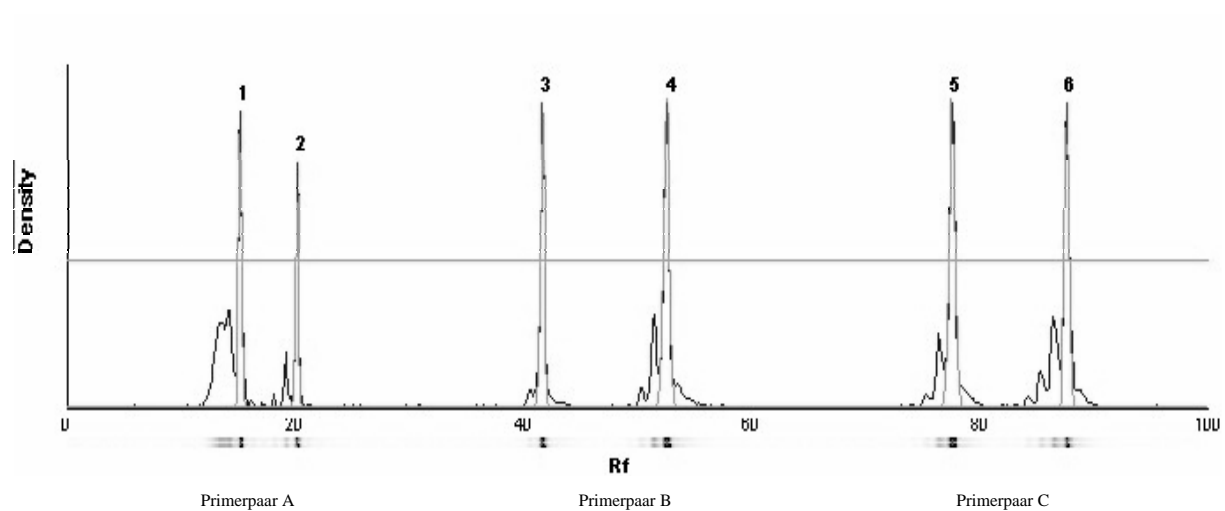


Abbildung 10: 1DScanEx-Auswertung einer Multiplex-PCR mit 3 verschiedenen Primerpaaren (Sw803, Sw349, Sw2443)

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse erfolgte mit Hilfe der Software CRIMAP Version 2.4 (GREEN et al., 1990). Es wurden Zwei- und Mehrpunkt-Analysen durchgeführt. Aufgrund der relativ geringen Tierzahl wurden ausschließlich geschlechtsneutrale Kopplungskarten erstellt. Lod-Score-Werte, die größer als 3 waren, wurden als Kriterium für die signifikante Kopplung zweier Marker definiert. Multilocus-Analysen wurden mit der BUILD-Option des CRIMAP-Programmes durchgeführt. Dadurch wurden größere Kopplungsgruppen aufgebaut. Die Überprüfung der Markerabfolge und der Signifikanz der Zuordnung erfolgte mit der Option FLIPS. Die Wahrscheinlichkeit der Markerzuordnung wurde als Lod-Wert (logarithm of the odds) angegeben. Die Lod-Score-Werte sind das statistische Maß für das Vorhandensein einer Kopplung. In Abhängigkeit der Rekombinationshäufigkeit zwischen zwei Markern wird ihr Abstand in centi-Morgan (cM) angegeben. Die Umrechnung der Rekombinationsraten in cM erfolgte mit der von der Software verwendeten Kosambi-Kartierungsfunktion (KOSAMBI, 1944).

3.7.2 QTL-Kartierung

Die statistischen Analysen zur Kartierung von Geneffekten erfolgte mit der online-Anwendung *QTL-Express* (Seaton et al., 2002; <http://qtl.cap.ed.ac.uk/>).

Die Analyse basierte auf der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate für Inzucht- und Auszucht-Linien (HALEY et al., 1994). Das allgemeine lineare Modell wurde voreingestellt für die fixen Merkmale Geschlecht und Untersuchungsgruppe.

Das Infektionsalter wurde als Covariante mitgeführt. Chromosomweite und genomweite Signifikanzschwellen wurden durch Permutationstests geschätzt (CHURCHILL & DOERGE, 1994). Alle mindestens chromosomweit signifikante QTL ($p \leq 0,05$) wurden als QTL dargestellt. Genomweit signifikante QTL wurden aufgrund ihres Signifikanzniveaus folgendermaßen unterteilt: *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$) und * ($p \leq 0,05$).

4. Ergebnisse

4.1 Phänotyp

Der Phänotyp der F₂-Tiere wurde anhand klinischer und klinisch-chemischer Parameter, Immunglobulin-Titer und der Bradyzoitenzahlen pro Gramm Muskulatur im M.l.d. bzw. im Herzmuskel charakterisiert (HEPP, 2006). In die vorliegende Arbeit wurden nur die Merkmale mit direkter Relevanz für die Sarkozystose aufgenommen.

4.2 Genotypen

4.2.1 Analyse der Mikrosatellitenloci

Die in die vorliegende Untersuchung einbezogenen Mikrosatelliten-Marker zeigt Tabelle 14. Sortiert nach Chromosom (SSC) und chromosomaler Position (in cM) werden hier die detektierten Fragmentlängen der Allele, getrennt nach Founderrasse, aufgelistet. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Markern finden sich unter den jeweiligen Referenzen. Die daraus resultierende Darstellung der Kopplungskarten findet sich unter 4.2.2.

Tabelle 14: Marker, sortiert nach Chromosomen (SSC: Sus scrofa Chromosom) und Position (cM). Allele der Founderrassen (PI: Pietrain, ME: Meishan).

Marker	SSC	Position (cM)	Allele Fragmentlängen PI	Allele Fragmentlängen ME	Referenz
Sw552	1	0	115 120 122	104 133	Rohrer et al. (1994)
Sw1332		20	87 89 98	79 91	Rohrer et al. (1996)
Sw1123		44	179 181	150 176	Fredholm et al. (1993)
Sw780		72	115 120	130	Rohrer et al. (1994)
Sw803		85	88 90	88 90	Rohrer et al. (1994)
Sw705		113	143 147 156	158 161	Rohrer et al. (1994)

Tabelle 14 (Fortsetzung): Marker, sortiert nach Chromosomen (SSC: *Sus scrofa* Chromosom) und Position (cM). Allele der Founderrassen (PI: Pietrain, ME: Meishan).

Marker	SSC	Position (cM)	Fragmentlängen PI	FragmentlängenME	Referenz
Sw2443	2	0	208	199 210	Alexander et al. (1996a)
Sw1650		27	122 125	141 145	Rohrer et al. (1996)
Sw240		42	91 103	88 93 95	Rohrer et al. (1994)
S0091		64	158 164	148 150 166	Fredholm et al. (1993)
Swr2157		89	106 108 117 122 114	102 106 104	Rohrer et al. (1996)
Swr345		114	136 142 159 171	139 141	Rohrer et al. (1994)
Swr308		128	136 141 155 158	141 151	Rohrer et al. (1994)
Sw72	3	0	89 93	95 107	Rohrer et al. (1994)
S0206		25	191 199 205	175	Robic et al. (1995)
Swr978		36	118	123 144	Rohrer et al. (1994)
Sw2570		55	158 176 178 152	152 160	Alexander et al. (1996b)
Sw349		95	152 154 173	152	Rohrer et al. (1994)
Sw489	4	0	158 173	156 171 173	Rohrer et al. (1994)
Sw835		22	220 224 228	238	Rohrer et al. (1994)
S0001		37	181 183 187 189	177 179	Fredholm et al. (1993)
S0073		70	85 105 108 112	95 101 108	Fredholm et al. (1993)
Sw2435		98	142 149	155 171 180	Rohrer et al. (1996)
Sw856		125	166 183 199	148 164 168	Rohrer et al. (1996)
Sw413	5	0	162 171	160 164	Rohrer et al. (1994)
Sw1482		32	99 134 138	81 91	Alexander et al. (1996b)
Swr453		50	185 189	172	Rohrer et al. (1994)
S0092		64	137 149 151 160	137 139 142	Fredholm et al. (1993)
S0005		80	202 233 235 243	202	Fredholm et al. (1993)
S0018		100	250 260 262	244 258	Coppieters et al. (1993)
Sw378		126	118 120	105 115 118	Rohrer et al. (1994)
S0035	6	0	174 179 182	180 183	Brown et al. (1995)
Sw1057		40	155 159 166	187 191	Rohrer et al. (1994)
S0087		56	163	193	Ellegren et al. (1993)
Sw492		62	88 90 94 104	94	Rohrer et al. (1994)
Sw824		104	114 132 135	114 138	Rohrer et al. (1994)
Sw322		143	103 109 112 114	105 107	Rohrer et al. (1994)
Sw2052		158	141 145 152	130 137 143	Alexander et al. (1996b)
S0025	7	0	102 103 104	96 101	Coppieters et al. (1993)
S0064		27	117 136 139 143	120	Fredholm et al. (1993)
LTA		55	193 199	172 176 190	Chardon et al. (1991)
Sw2428		87	173	171	Smith et al. (1995)

Tabelle 14 (Fortsetzung): Marker, sortiert nach Chromosomen (SSC: *Sus scrofa* Chromosom) und Position (cM). Allele der Founderrassen (PI: Pietrain, ME: Meishan).

Marker	SSC	Position (cM)	Fragmentlängen PI	FragmentlängenME	Referenz
Sw1083	7	106	109 112	126 148	Rohrer et al. (1994)
Sw581		120	198 204	199 204	Rohrer et al. (1994)
S0212		137	229 234	242	Robic et al. (1994)
Sw764		152	107 109 112	115	Rohrer et al. (1994)
Sw2410	8	0	100 108 111	115 118	Alexander et al. (1996b)
Swr1101		40	115 160	123 158	Rohrer et al. (1994)
Sw1953		60	154	150 152 161	Alexander et al. (1996b)
Sw2160		82	182 186	173 188	Alexander et al. (1996b)
Sw790		109	168 171	179	Rohrer et al. (1994)
Sw1980		128	183 187 195 199	187 190	Alexander et al. (1996b)
Sw21	9	0	122 132 135	132 141	Alexander et al. (1996b)
Sw911		22	155 159 166	149 155	Rohrer et al. (1994)
Sw1434		56	138 158 160	150	Alexander et al. (1996b)
Sw2093		89	119 131 139	96 98	Alexander et al. (1996b)
Sw749		125	98 104	100 102	Rohrer et al. (1994)
Sw767	10	0	115 122	138 150	Rohrer et al. (1994)
Sw497		19	96 98 102	89 91 96	Rohrer et al. (1994)
Sw1041		47	87 94	92	Rohrer et al. (1994)
Sw1708		81	106 112 114 116 121	81 98	Alexander et al. (1996b)
Sw2067		108	112 132 135 137	101 107	Rohrer et al. (1996)
S0385	11	0	166 168 170 172	162 188	Riquet et al. (1995)
S0182		33	111 127 130	127 138	Ellegren et al. (1995)
Sw903		77	193 200 207	197 203	Rohrer et al. (1994)
S0143	12	0	140 153 155 157	157 160 162	Wilke et al. (1994)
Sw957		27	105 122 126 135	152	Rohrer et al. (1994)
Sw874		58	201 205 210	189 203	Rohrer et al. (1994)
S0090		74	239 243	247	Fredholm et al. (1993)
Swc23		90	127	130 144	Alexander et al. (1996b)
Swr1021		107	93 102	87 91	Rohrer et al. (1994)
S0219	13	0	158	172	Robic et al. (1994)
Sw344		34	155 157 159 184	155 161	Rohrer et al. (1994)
Sw225		69	86	94 102	Rohrer et al. (1994)
Sw2440		101	136 143 153	149 151	Alexander et al. (1996b)
S0215		120	150	132 158 192	Robic et al. (1994)
Sw2038	14	0	104 114 118	115	Alexander et al. (1996b)
Sw2519		32	186 215 228	195 207 222	Alexander et al. (1996b)

Tabelle 14 (Fortsetzung): Marker, sortiert nach Chromosomen (SSC: *Sus scrofa* Chromosom) und Position (cM). Allele der Founderrassen (PI: Pietrain, ME: Meishan).

Marker	SSC	Position (cM)	Fragmentlängen PI	FragmentlängenME	Referenz
Sw761	14	57	152 154 156	146 158	Rohrer et al. (1994)
Sw2515		90	91 93 97	83	Alexander et al. (1996a)
S0148	15	0	147 150 161 170	151 176	Wilke et al. (1994)
S0118		25	214	205 218	Groenen et al (1995)
Sw2083		46	143 156 158	150	Alexander et al. (1996a)
Sw1983		66	177 185 180 188 192	162 166 177	Alexander et al. (1996b)
Sw742	16	0	202 204 219 223	191	Rohrer et al. (1994)
Sw419		15	161 164 167	152 167	Rohrer et al. (1994)
Sw1809		28	120 124	140 153	Alexander et al. (1996b)
Swr2480		46	225 230 248	227 256	Alexander et al. (1996b)
Sw1897		77	154 160	162	Alexander et al. (1996b)
Sw335	17	0	104	93 95	Rohrer et al. (1994)
S0296		32	164 175	179	Hoyheim et al. (1995)
Sw1031		63	86	96 104 108	Rohrer et al. (1994)
Sw2431		94	155 161	158	Alexander et al. (1996b)
Sw1808	18	0	100 149 151	133 136	Alexander et al. (1996b)
Sw787		32	152 154 160	152 156	Rohrer et al. (1994)
S0120		46	151 170	161 166	Groenen et al (1995)
Sw949	X	0	185 205	172 185	Rohrer et al. (1994)
Sw2126		36	141 148	153 155	Alexander et al. (1996b)
S0117		75	160 162	181 185	Groenen et al (1995)
Sw1608		103	119 135	121	Alexander et al. (1996b)
Sw2588		149	110	116 119	Lopez-Corrales et al. (1999)

4.2.2 Kopplungskarten der Chromosomen

Mit der Software CRIMAP Version 2.4 (GREEN et al., 1990) wurde die Kopplungsanalyse durchgeführt. Die nach eigenen Ergebnissen erstellten Kopplungskarten der einzelnen Chromosomen sind in Abbildung 11 dargestellt.

Aufgrund der relativ geringen Tierzahl wurden ausschließlich geschlechtsneutrale Kopplungskarten erstellt. Die Umrechnung der Rekombinationsraten in cM erfolgte mit der von der Software verwendeten Kosambi-Kartierungsfunktion (KOSAMBI, 1944).

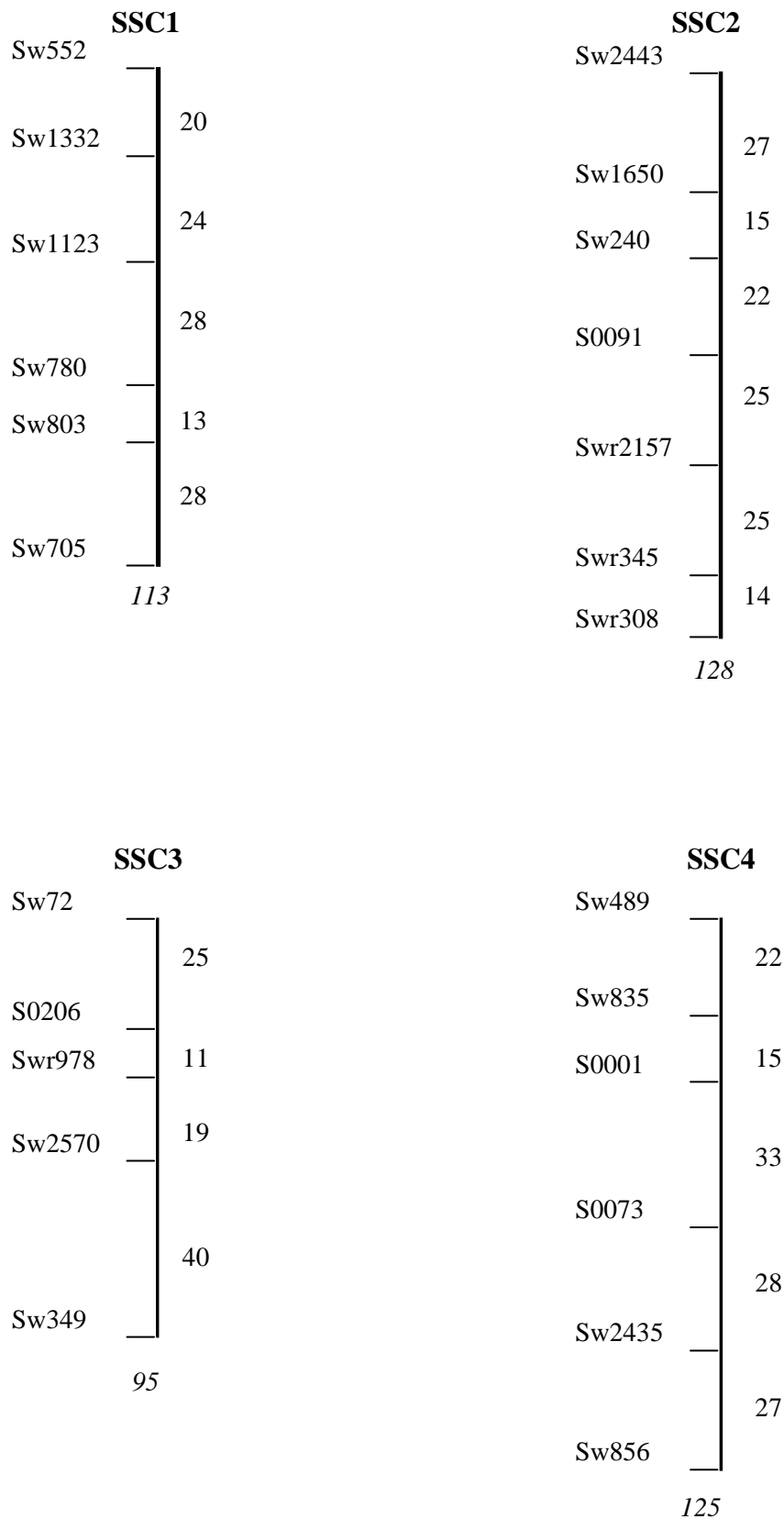


Abbildung 11 : Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): Links: Markernamen; Rechts: Abstände der Marker in cM; Unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM.

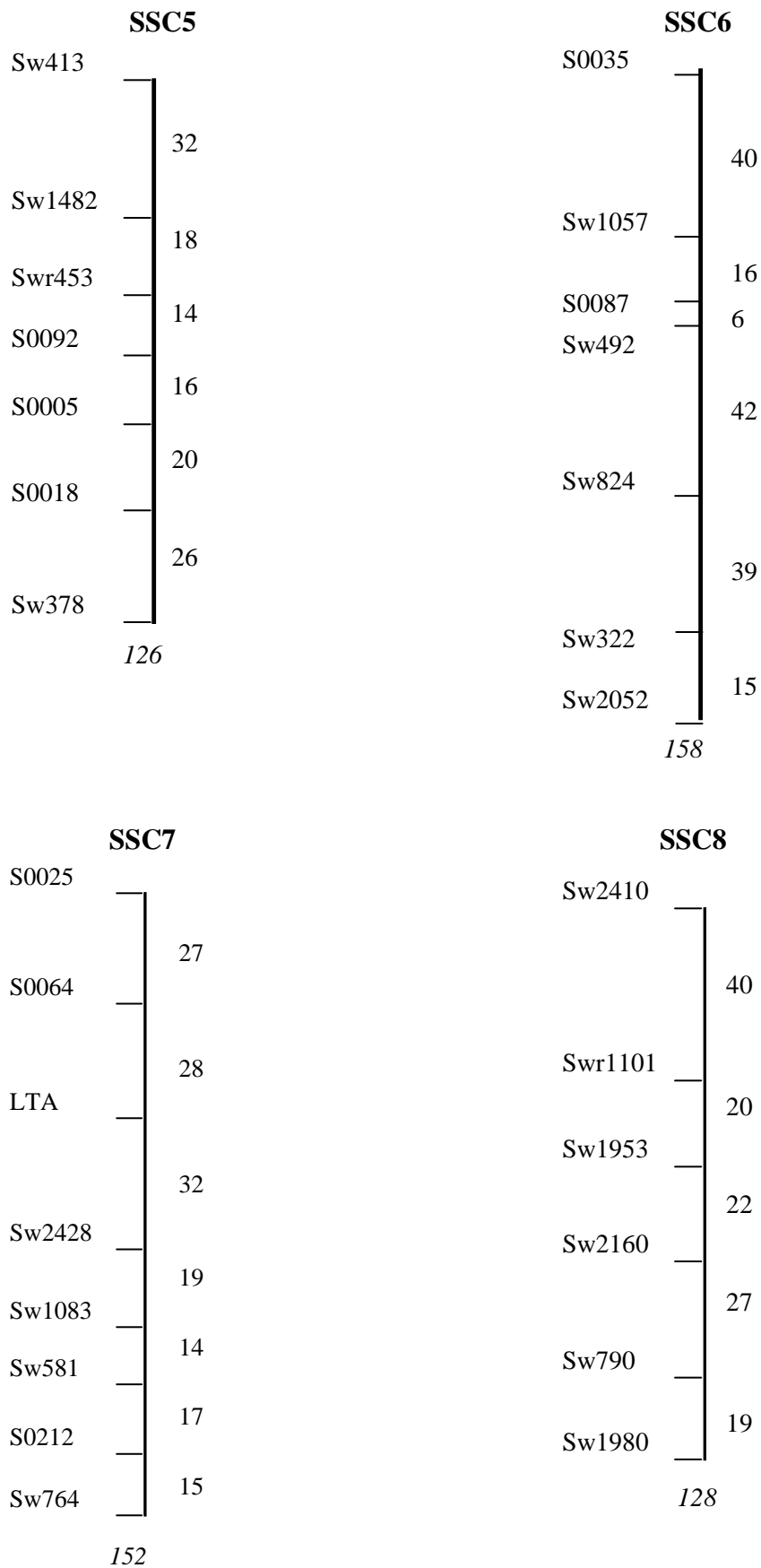


Abbildung 11 (Fortsetzung) Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): Links: Markernamen; Rechts: Abstände der Marker in cM; Unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM.

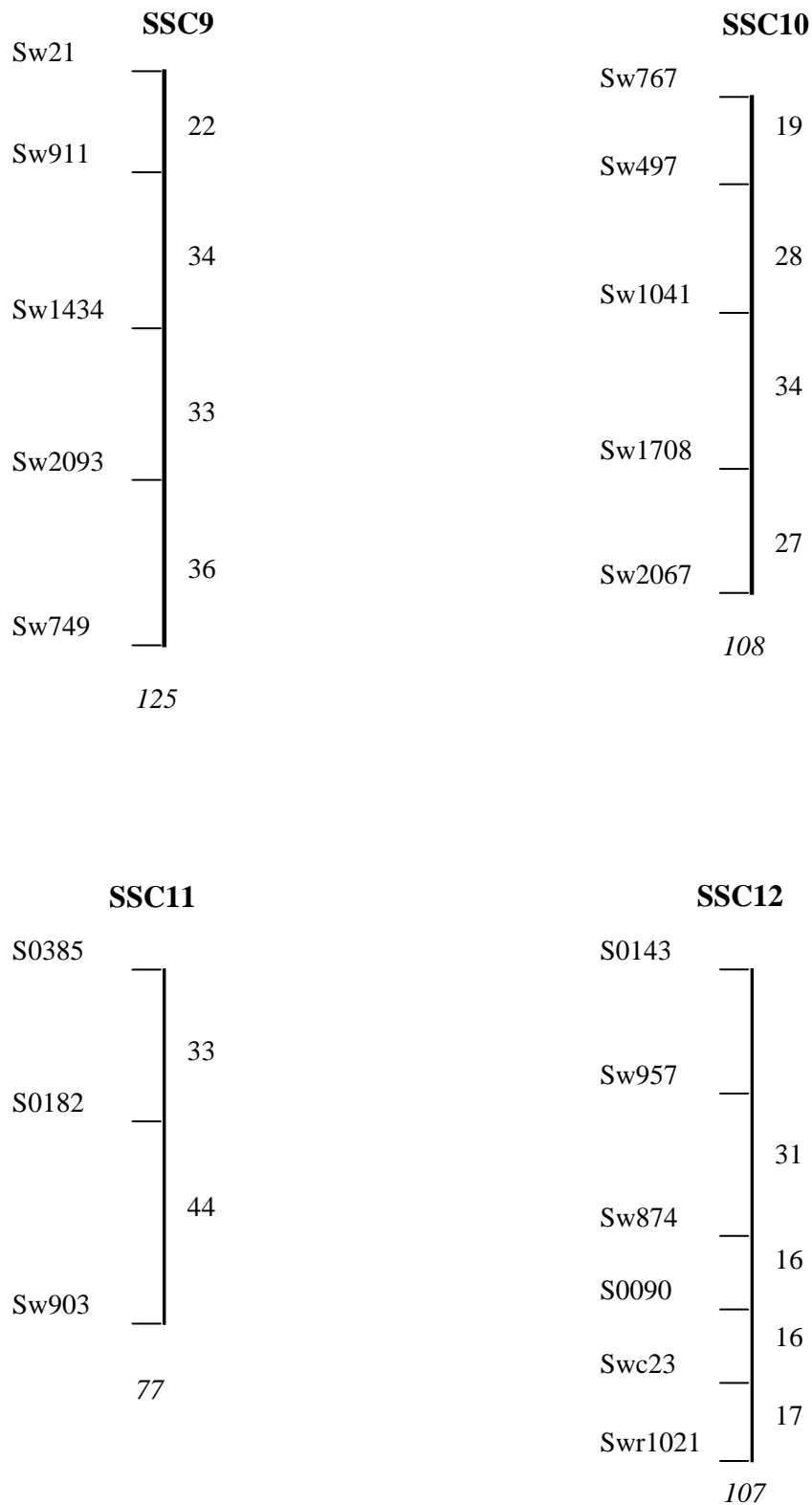


Abbildung 11 (Fortsetzung): Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): Links: Markernamen; Rechts: Abstände der Marker in cM; Unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM.

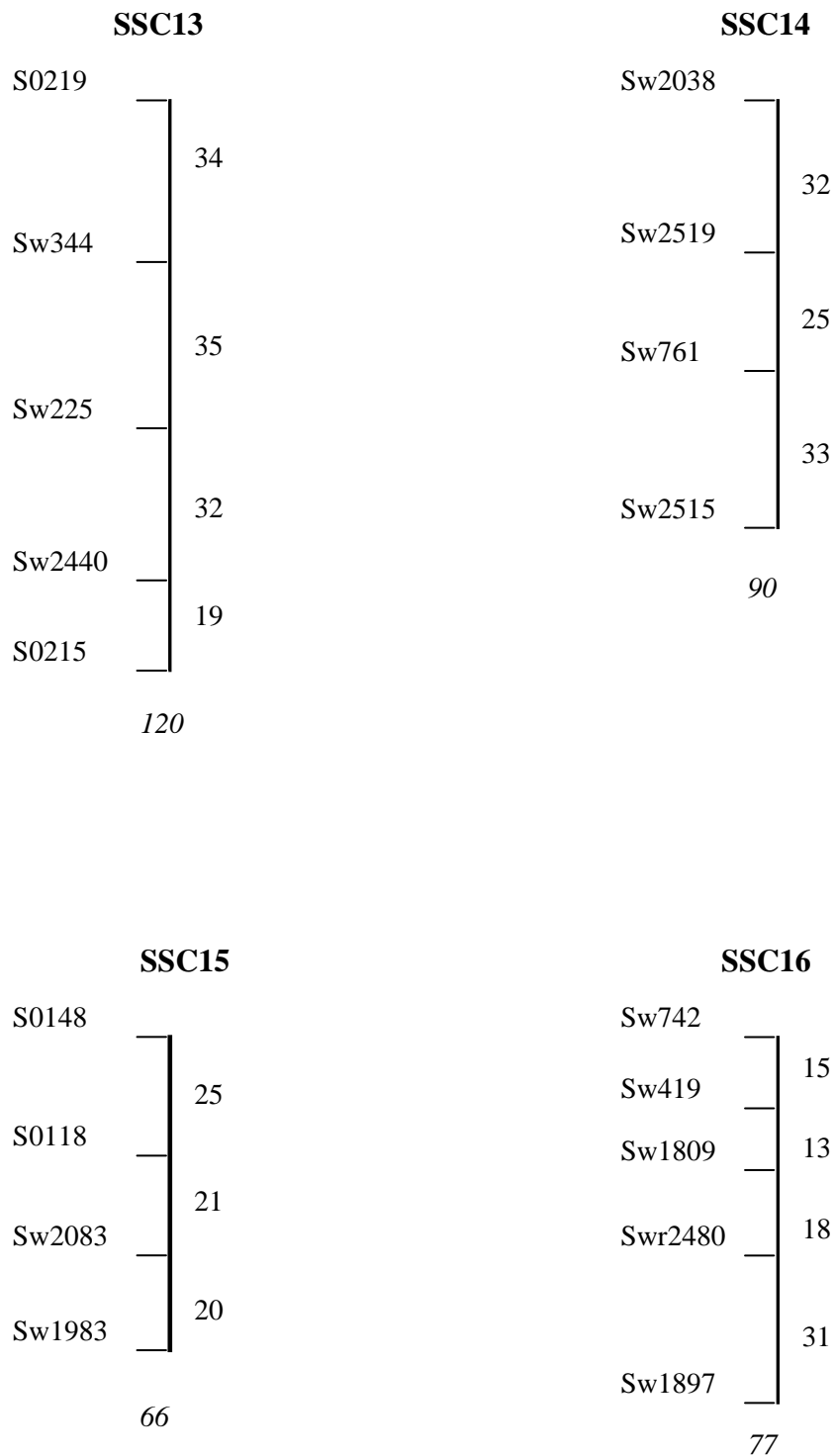


Abbildung 11 (Fortsetzung): Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): Links: Markernamen; Rechts: Abstände der Marker in cM; Unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM.

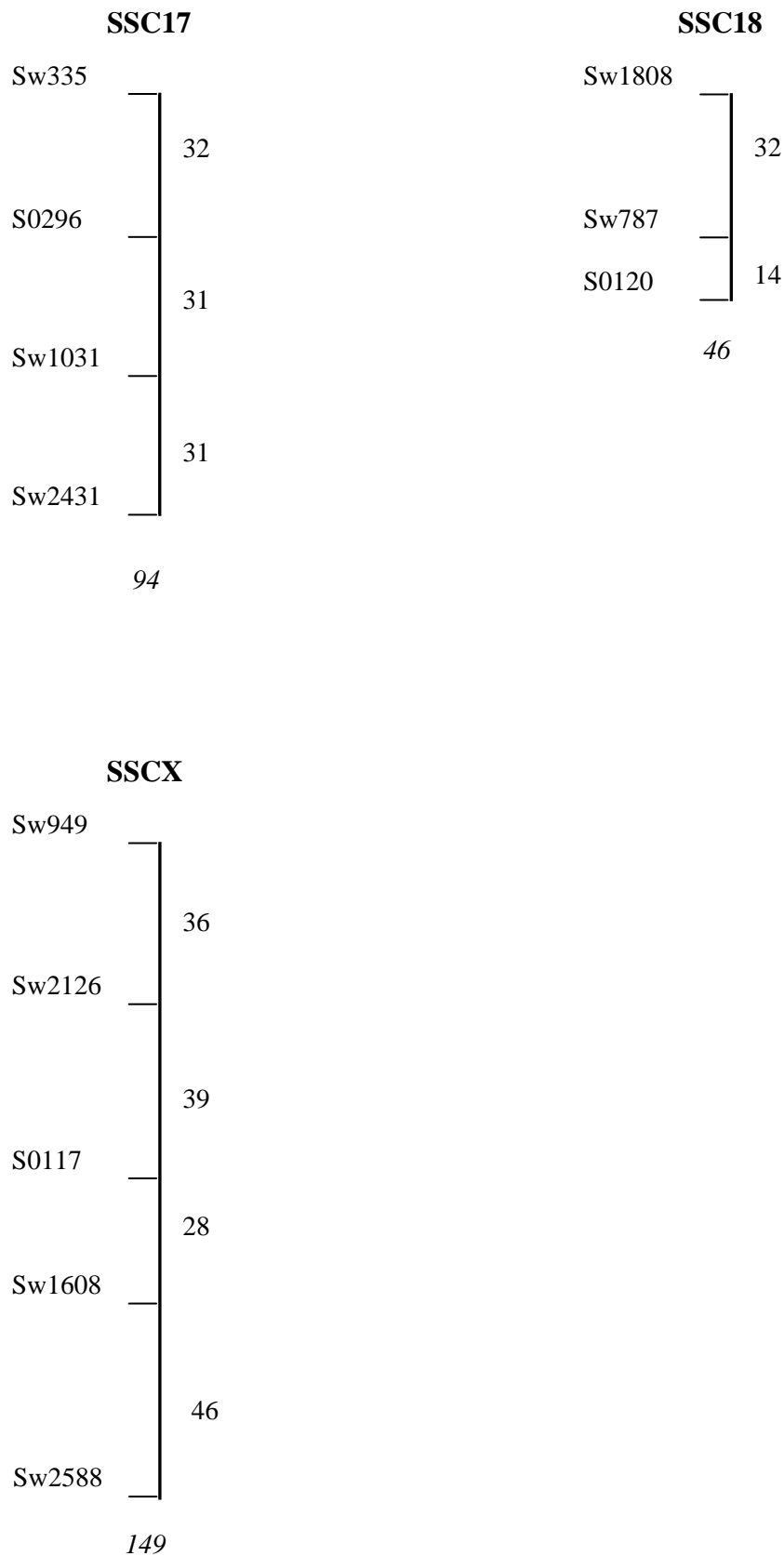


Abbildung 11 (Fortsetzung): Kopplungskarten der Chromosomen (SSC): Links: Markernamen; Rechts: Abstände der Marker in cM; Unten: Gesamtlänge der Chromosomen in cM.

4.3 QTL-Kartierung

4.3.1 Übersicht

Die QTL-Analyse ergab für die unterschiedlichen phänotypischen Merkmale 42 chromosomweit und 14 genomweit signifikante QTL (Tab. 15). Bedeutsame QTL wurden auf den Chromosomen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 17 und dem X-Chromosom kartiert.

Die F-Werte für genomweite Signifikanz-Schwellen lagen bei 14,0 ($p \leq 0,001$), 11,2 ($p \leq 0,01$) und 8,2 ($p \leq 0,05$). Die F-Wert-Schwelle für die chromosomenweite Signifikanz wurde auf 5,5 ($p = 0,05$) geschätzt. Alle QTL mit einem F-Wert ≥ 5.5 sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Die kumulativen F-Werte waren am höchsten auf den Chromosomen SSC1, SSC2, SSC5, SSC6, SSC7 und SSC14.

Die genomweit signifikanten Einzel-QTL erklärten zwischen 12,6 und 32,9 % der phänotypischen Gesamtvarianz der F_2 -Tiere. Die chromosomweit signifikanten QTL ($F > 5,5$) erklärten 5,2 bis 15,6% der F_2 -Varianz. Die kumulative F_2 -Varianz, die durch mehrere QTL für ein Merkmal erklärt wurde, lag zwischen 5,2 und 69,8 %.

Tabelle 15: QTL sortiert nach Chromosom und F-Wert. SSC: Chromosom; cM: Position auf dem Chromosom; F: F-Wert; p: Signifikanzniveau: gelistet sind alle QTL, die zumindest chromosomweit signifikant sind ($p \leq 0.05$); genomweit signifikante QTL sind bezeichnet mit * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), und *** ($p \leq 0.001$); Markerbereich: ungefähre Lage des QTL relativ zu den Markern; Phänotypmerkmal und Zeit: Merkmal beurteilt zum Zeitpunkt in Tagen nach Infektion; %s: die durch den QTL erklärte Phänotypvarianz in Prozent; a, d: Additiv- und Dominanz-Effekte des QTL; $\pm sda$, $\pm sdd$: Standardabweichungen der a- und d-Werte.

SSC	cM	F	p	Markerbereich		Phänotypmerkmal	Zeit	%s	a	$\pm sda$	d	$\pm sdd$
1	106	9.61	*	Sw803	Sw705	CK/AST	28	14.87	5.91	1.81	-7.82	2,98
	76	7.27		Sw780	Sw803	AST	42	8.59	-0.01	0.02	-0.13	0,03
	113	6.07		Sw705		Eosinophile	14	9.78	0.61	0.28	-1.00	0,40
	72	5.90		Sw780		logCK	42	10.51	0.01	0.04	-0.17	0,05

Tabelle 15 (Fortsetzung): QTL sortiert nach Chromosom und F-Wert.

SSC	cM	F	p	Markerbereich		Phänotypmerkmal	Zeit	%s	a	±sda	d	±sdd
2	100	10.42	*	Swr2157	Swr345	Rektaltemperatur	14	15.689	-0.039	0.04	0.02	0,14
	121	6.07		Swr345	Swr308	Rektaltemperatur	14	9.71	-0.01	0.06	-0.33	0,09
	87	6.02		Swr2157		Rektaltemperatur	28	9.84	-0.04	0.05	0.26	0,08
	64	5.68		S0091		Bradyzoiten Herz	70	13.80	0.30	0.17	-0.58	0,22
3	42	9.12	*	Swr978		Rektaltemperatur	42	14.57	0.19	0.05	-0.15	0,08
	26	7.93		S0206		Thrombozyten	42	14.06	-42.39	17.02	72.66	23,55
	26	7.93		S0206		Thrombozyten	42	14.06	-42.39	17.02	72.66	23,55
	36	7.11		Swr978		Thrombozyten	42	12.13	-56.66	15.09	-6.74	20,98
	31	6.52		S0206	Swr978	logCK	0	11.50	0.15	0.04	0.01	0,06
	25	6.29		S0206		Thrombozyten	0	9.93	-5.50	15.72	-75.06	21,28
4	32	8.87	*	Sw853	S0001	IgG1	42	15.04	0.10	0.04	-0.16	0,05
5	23	7.60		Sw413	Sw1482	Thrombozyten	14	15.63	-27.72	14.94	-88.57	25,56
	96	6.51		S0018		IgG	28	11.22	-0.057	0.02	-0.08	0,03
	118	6.41		S0018	Sw378	IgG2	28	11.232	0.081	0.031	-0.14	0,06
	30	5.57		Sw1482		Thrombozyten	42	9.76	-31.72	15.12	-60.14	23,06
	50	5.55		Swr453		IgM	0	9.45	-0.03	0.01	0.0049	0,013
6	68	8.66	*	Sw492	Sw824	CK/AST	42	13.71	-6.15	1.49	-0.17	2,32
	158	7.06		Sw322	Sw2052	Rektaltemperatur	42	11.57	-0.098	0.06	-0.297	0,083
	84	6.74		Sw492	Sw824	Thrombozyten	14	14.12	-33.82	21.05	128.24	43,35
	86	6.71		Sw492	Sw824	Thrombozyten	42	11.53	-35.07	24.37	143.62	47,36
	60	6.45		S0087	Sw492	Rektaltemperatur	14	10.34	0.21	0.10	0.51	0,16
	60	6.13		Sw492		CK/AST	0	10.11	-3.30	2.14	-11.34	3,34
7	152	20.92	***	Sw764		IgG2	42	29.04	-0.21	0.03	-0.06	0,05
	57	17.39	***	LTA	Sw2428	Bradyzoiten M.l.d.	70	32.88	0.69	0.12	-0.08	0,19
	27	5.95		S0064		Thrombozyten	14	12.68	-18.60	14.24	56.18	19,18
	137	5.64		S0212		logCK	42	10.13	-0.09	0.03	-0.08	0,05
8	124	9.30	*	Sw790	Sw1980	CK/AST	42	14.57	-1.20	1.49	-10.16	2,37
	91	6.59		Sw2160	Sw790	IgG2	28	11.59	0.07	0.03	-0.09	0,04
10	87	9.65	*	Sw1708	Sw2067	AST	42	16.02	-0.10	0.02	0.05	0,04
	0	5.82		Sw767		CK/AST	42	9.64	-2.18	1.21	-4.73	1,64
11	70	6.02		S0182	Sw903	Rektaltemperatur	14	9.75	-0.06	0.08	0.43	0,13
	69	5.66		S0182	Sw903	Eosinophile	14	9.24	-1.05	0.31	-0.18	0,54
12	27	6.46		Sw957		IgG	42	11.22	-0.10	0.03	0.05	0,04
	107	6.26		Swr1021		IgM	14	10.59	-0.03	0.01	-0.03	0,02
	0	5.97		S0143		Eosinophile	28	9.90	1.06	0.41	-1.08	0,59

Tabelle 15 (Fortsetzung): QTL sortiert nach Chromosom und F-Wert.

SSC	cM	F	p	Markerbereich		Phänotypmerkmal	Zeit	%s	a	±sda	d	±sdd
12	0	5.62		S0143		Eosinophile	28	9.68	1.02	0.43	-1.21	0,63
13	25	7.22		S0219	Sw344	Rektaltemperatur	0	11.28	0.03	0.03	-0.19	0,05
	18	6.93		S0219	Sw344	IgM	14	11.79	-0.04	0.01	-0.05	0,02
14	33	8.04		Sw2519	Sw761	AST	14	13.84	-0.08	0.02	0.01	0,03
	0	6.86		Sw2038		logCK	42	12.05	0.13	0.03	-0.01	0,05
	0	5.71		Sw2038		CK/AST	0	9.48	3.92	1.56	-5.49	2,22
15	56	5.97		Sw2083	Sw1983	Rektaltemperatur	14	9.61	0.18	0.06	-0.17	0,10
16	37	7.46		Sw1809	Swr2480	Rektaltemperatur	14	11.68	0.31	0.08	0.06	0,13
	15	6.20		Sw419		Bradyzoiten M.l.d.	70	11.67	0.14	0.12	-0.06	0,19
17	83	15.61	***	Sw1031	Sw2431	IgG2	42	23.36	0.18	0.05	-0.35	0,07
	22	13.02	**	Sw335	S0296	Eosinophile	28	19.24	1.95	0.48	-2.48	0,74
	41	8.32	*	S0296	Sw1031	Eosinophile	42	13.28	1.07	0.34	-1.72	0,53
	26	6.42		Sw335	S0296	Eosinophile	28	10.84	1.28	0.51	-2.11	0,74
18	37	7.31		Sw787	S0120	Thrombozyten	14	15.12	43.02	13.31	47.14	21,79
X	105	15.02	***	Sw1608		IgG2	28	23.19	0.19	0.05	-0.73	0,15
	31	9.38	*	Sw949	Sw2126	Eosinophile	42	15.19	-2.40	0.65	4.06	1,23
	126	6.79		Sw1608	Sw2588	Eosinophile	28	11.10	0.74	1.25	15.32	4,78

4.3.2 QTL klinischer Merkmale

Insgesamt konnten 23 QTL für klinische Merkmale kartiert werden: zehn QTL für die Rektaltemperatur und dreizehn QTL für die Herzfrequenz. Die Verhältnisse vor der Infektion wurden im Wesentlichen von einem QTL auf SSC1 (Herzfrequenz) und zwei QTL auf SSC13 (Herzfrequenz und Rektaltemperatur) bestimmt. Diese QTL verschwanden in der Phase der akuten Sarkozystose. Stattdessen wurden während dieser Phase fünf (Rektaltemperatur) bzw. sechs (Herzfrequenz) neue QTL kartiert. Diese elf QTL wurden in der Phase der chronischen Sarkozystose erneut durch zwei (Rektaltemperatur) bzw. drei (Herzfrequenz) neue QTL ersetzt (Abb. 12).

Die F-Werte der QTL für die Herzfrequenz waren allerings relativ niedrig. Zwei genomweit signifikante QTL für die Rektaltemperatur während der akuten Sarkozystose (Tag 14 p.i.) konnten auf SSC2 ($F=10,42$) bzw. für die Rektaltemperatur während der chronischen Sarkozystose (Tag 42 p.i.) auf SSC 3 ($F=9,12$) kartiert werden. Für die Herzfrequenz konnten keine genomweit signifikanten QTL nachgewiesen werden.

Die höchsten kumulativen Varianz-Anteile ergaben sich für die klinischen Merkmale Herzfrequenz (69,8%) und Rektaltemperatur (69,3%) während der akuten Sarkozystose.

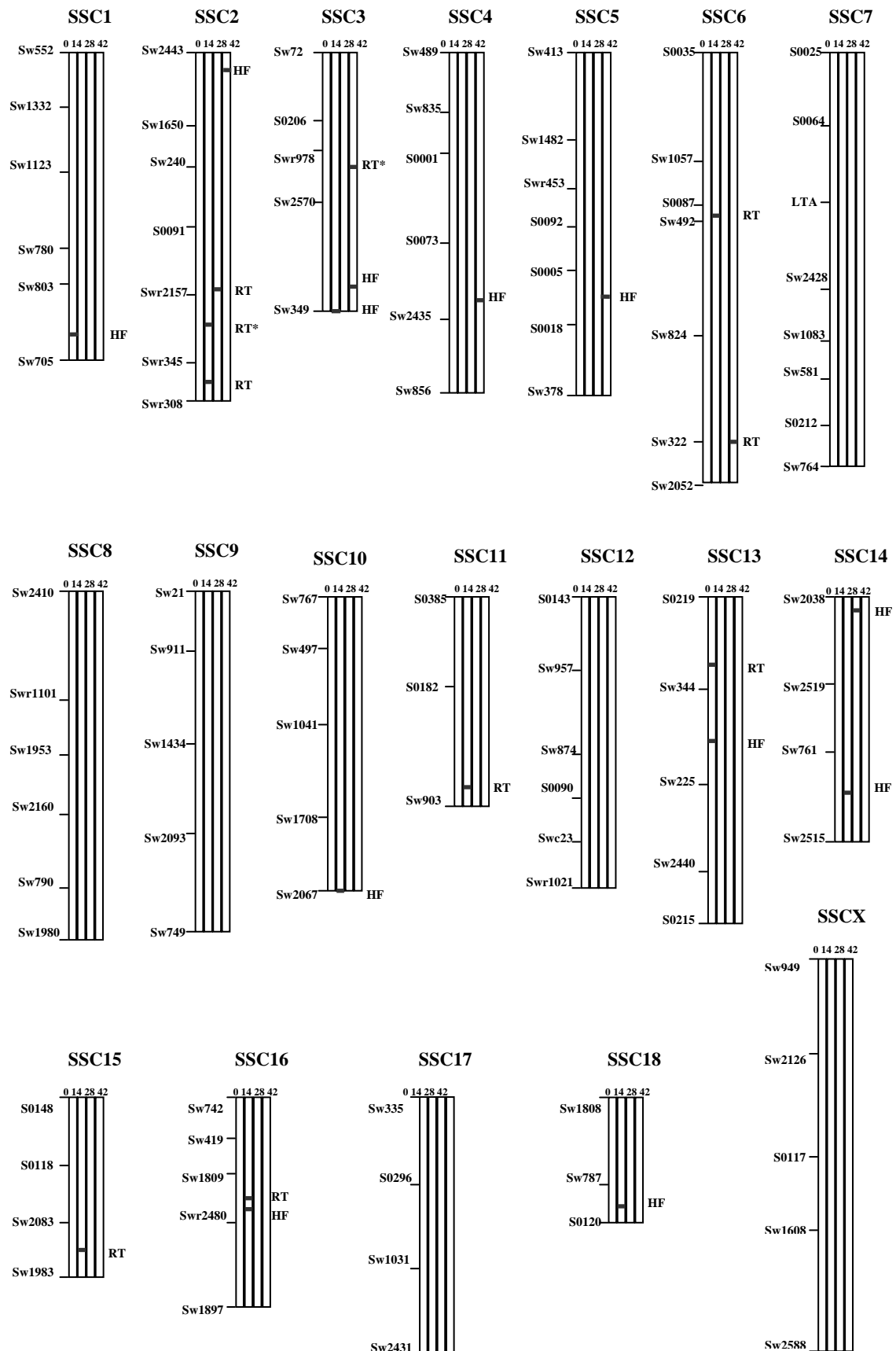


Abbildung 12: QTL klinischer Merkmale (HF: Herzfrequenz; RT: Rektaltemperatur)

4.3.3 QTL klinisch-chemischer Merkmale

Die AST- und CK-Werte wurden vor allem während der chronischen Sarkozystose durch verschiedene QTL beeinflusst. Für Tag 14 und 28 p.i. konnten keine QTL kartiert werden. Insgesamt konnten dreizehn mindestens chromosomweit signifikante QTL mit den Serumenzymen Aspartat-Amino-Transferase (AST) und Kreatinkinase (CK) in Verbindung gebracht werden. Vier QTL für CK-Werte, drei QTL für AST-Werte und sechs QTL für den Quotienten aus CK und AST (CK/AST). Darunter ein genomweit signifikanter QTL für die AST an Tag 42 p.i. auf SSC10 ($F=9,65$) zwischen den Markern Sw1708 und Sw2067 und drei genomweit signifikante QTL für den Quotienten aus CK/AST auf den Chromosomen 1 (Tag 28 p.i.; $F=9,61$), 6 (Tag 42 p.i.; $F=8,66$) und 8 (Tag 42 p.i.; $F=9,30$) (Abb. 13).

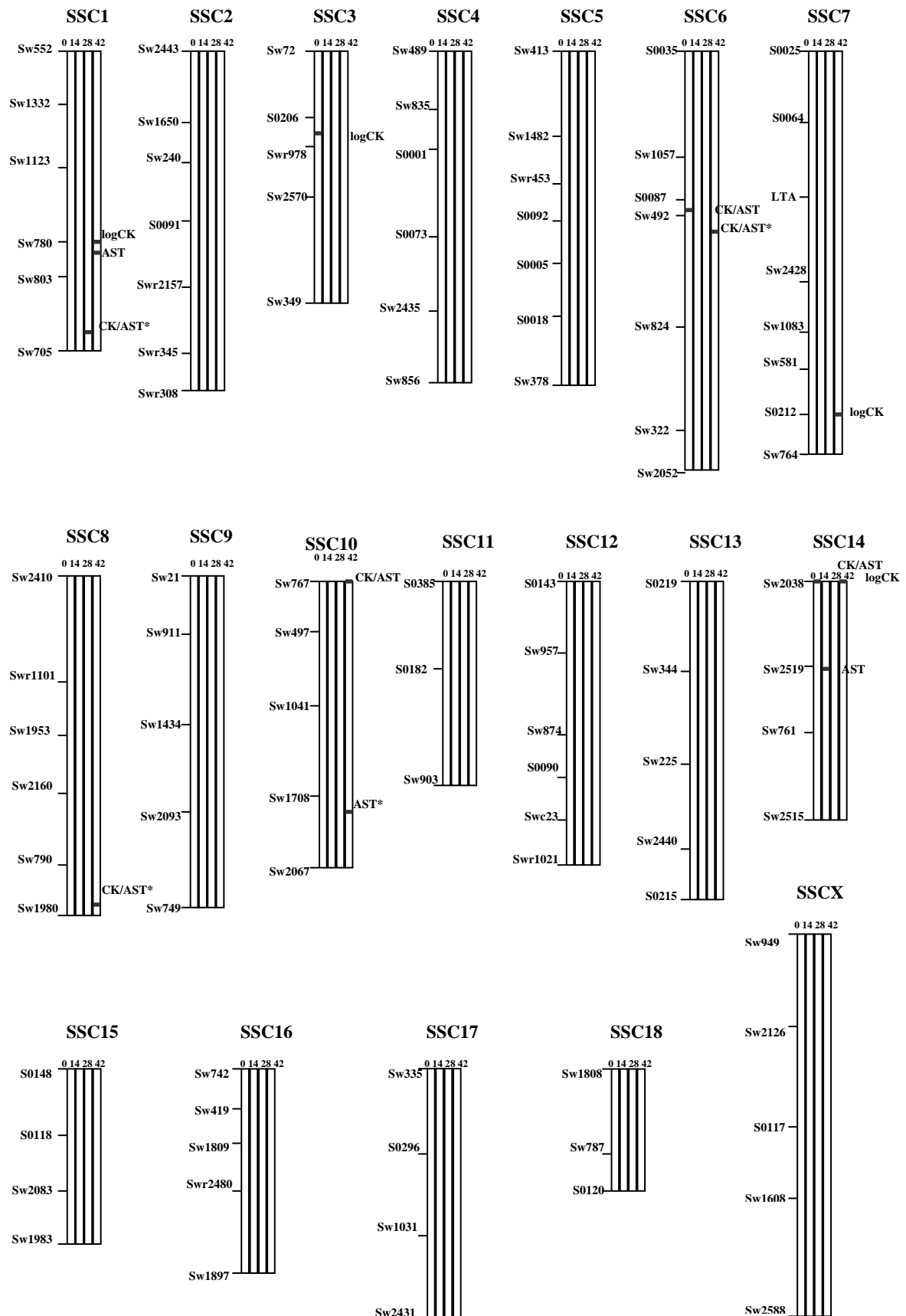


Abbildung 13: QTL klinisch-chemischer Merkmale

4.3.4 QTL hämatologischer Merkmale

Für das Blutbild konnten über 30 QTL, verteilt auf siebzehn Chromosomen, kartiert werden. Davon neun bzw. zehn QTL für die Zahl der Eosinophilen bzw. der Thrombozyten (Abb. 15). Die Thrombozytenzahl wurde während der akuten Sarkozystose (Tag 14 p.i.) von vier chromosomweit signifikanten QTL bestimmt. Je ein QTL auf SSC5, SSC6, SSC7 und SSC18. Für die Thrombozytenzahl in der Phase der chronischen Sarkozystose konnten drei QTL auf SSC3 und die beiden schon genannten QTL auf SSC 5 und SSC6 berechnet werden. Genomweit signifikante QTL konnten für die Thrombozytenzahl nicht kartiert werden. Die kumulative F_2 -Varianz der Thrombozytenzahl an Tag 14 p.i. summierte sich auf 57,6%.

Für die Zahl der Eosinophilen während der akuten und chronischen Sarkozystose konnten insgesamt neun QTL auf SSC1, SSC11, SSC12, SSC17 sowie dem X-Chromosom abgeleitet werden. Drei dieser QTL waren genomweit signifikant, der ausgeprägteste lag auf SSC17 (Tag 28 p.i.) im Bereich des Markers S0296 (F-Wert=13,02). Die kumulative F_2 -Varianz der Eosinophilenzahl an Tag 28 p.i. lag bei 49,7%.

Reinerbige Träger von Pietrainallelen am Marker S0296 zeigten an Tag 28 p.i. eine deutlich größere Zahl eosinophiler Granulozyten (Abb. 14). Für den Zeitraum der chronischen Sarkozystose (Tag 42 p.i.) konnten zwei genomweit signifikante QTL auf Chromosom 17 (F=8,32) und SSCX (F=9,38) aufgezeigt werden (Abb. 15). Diese beiden QTL erklärten zusammen 28,5% der phänotypischen Varianz unter den F_2 -Tieren während der chronischen Sarkozystose.

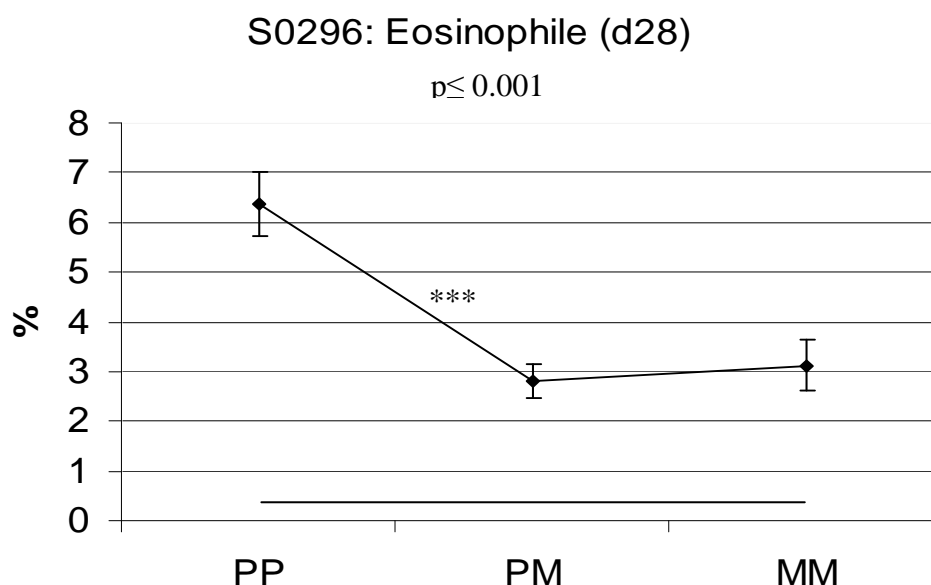


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen der Anzahl eosinophiler Granulozyten (Tag 28 p.i.) und Genotyp am Marker S0296 (Allele: P = Pietrain; M = Meishan)

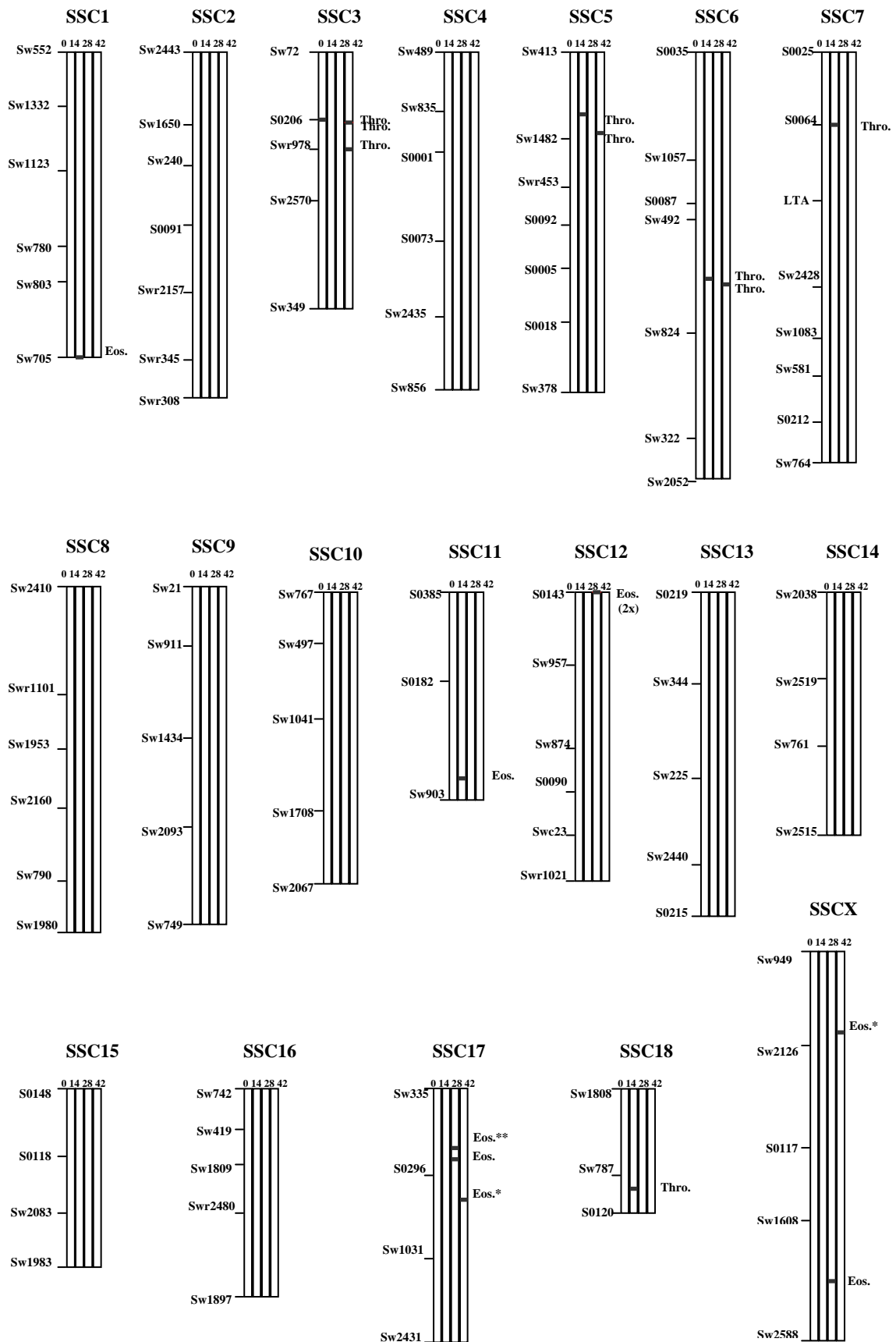


Abbildung 15: QTL hämatologischer Merkmale (Eos.: Eosinophile; Thro.: Thrombozyten)

4.3.5 QTL parasitologischer Merkmale

Für die Anzahl der in der Muskulatur gefundenen Bradyzoiten im M.l.d. und in der Herzmuskulatur konnten insgesamt drei QTL lokalisiert werden. Je ein QTL für das Merkmal Bradyzoiten pro Gramm M.l.d. wurde auf SSC7 ($F=17,39$) und SSC16 ($F=6,20$) gefunden, ein weiterer für Bradyzoiten pro Gramm Herzmuskulatur auf SSC2 ($F=5,68$) (Abb. 17). Die QTL auf SSC7 und SSC 16 erklärten zusammen 44,65% der F_2 -Varianz für dieses Merkmal ($p < 0,001$). Die beiden QTL auf Chromosom 2 und 16 waren lediglich chromosomweit signifikant.

Der sehr bedeutsame genomweit signifikante QTL auf SSC7 mit einem F-Wert von 17,39 konnte in der Region des MHC-kodierenden Bereiches kartiert werden. Dieser Bereich liegt zwischen den Markern LTA (Lymphotoxin A) und Sw2428. Der QTL konnte in der Nähe des Markers LTA, wie es in Abbildung 16 dargestellt ist, kartiert werden.

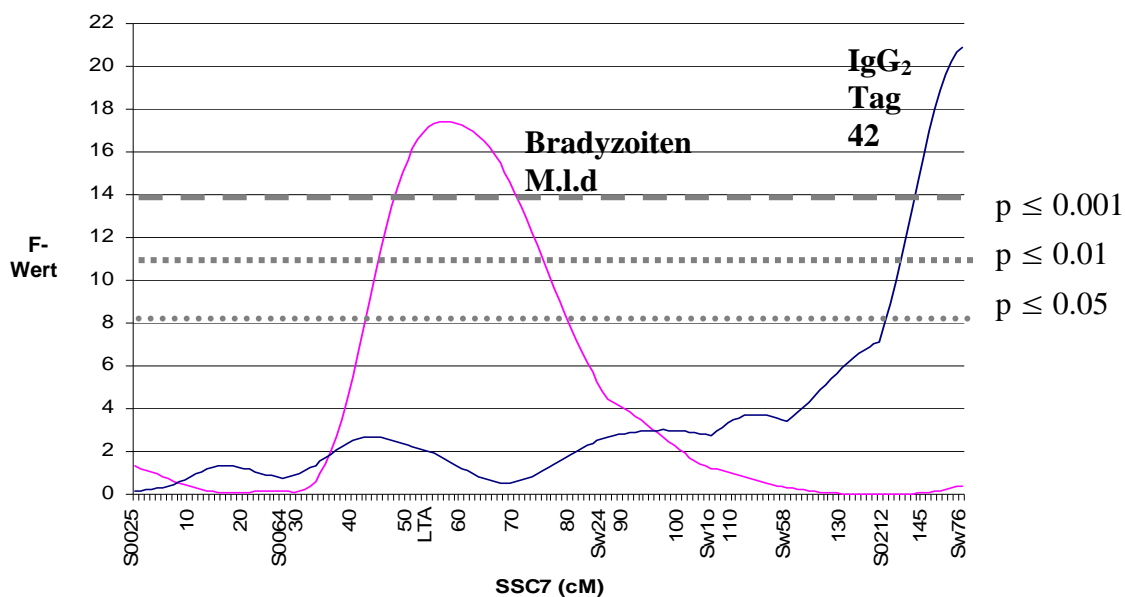


Abbildung 16: Auf SSC7 konnten zwei ausgeprägte QTL für die Bradyzoitenzahl im M.l.d. ($F=17,39$) im Bereich des Markers LTA sowie für die IgG_2 -Spiegel (Tag 42 p.i.) ($F=20,92$) im Bereich des Markers Sw764 kartiert werden.

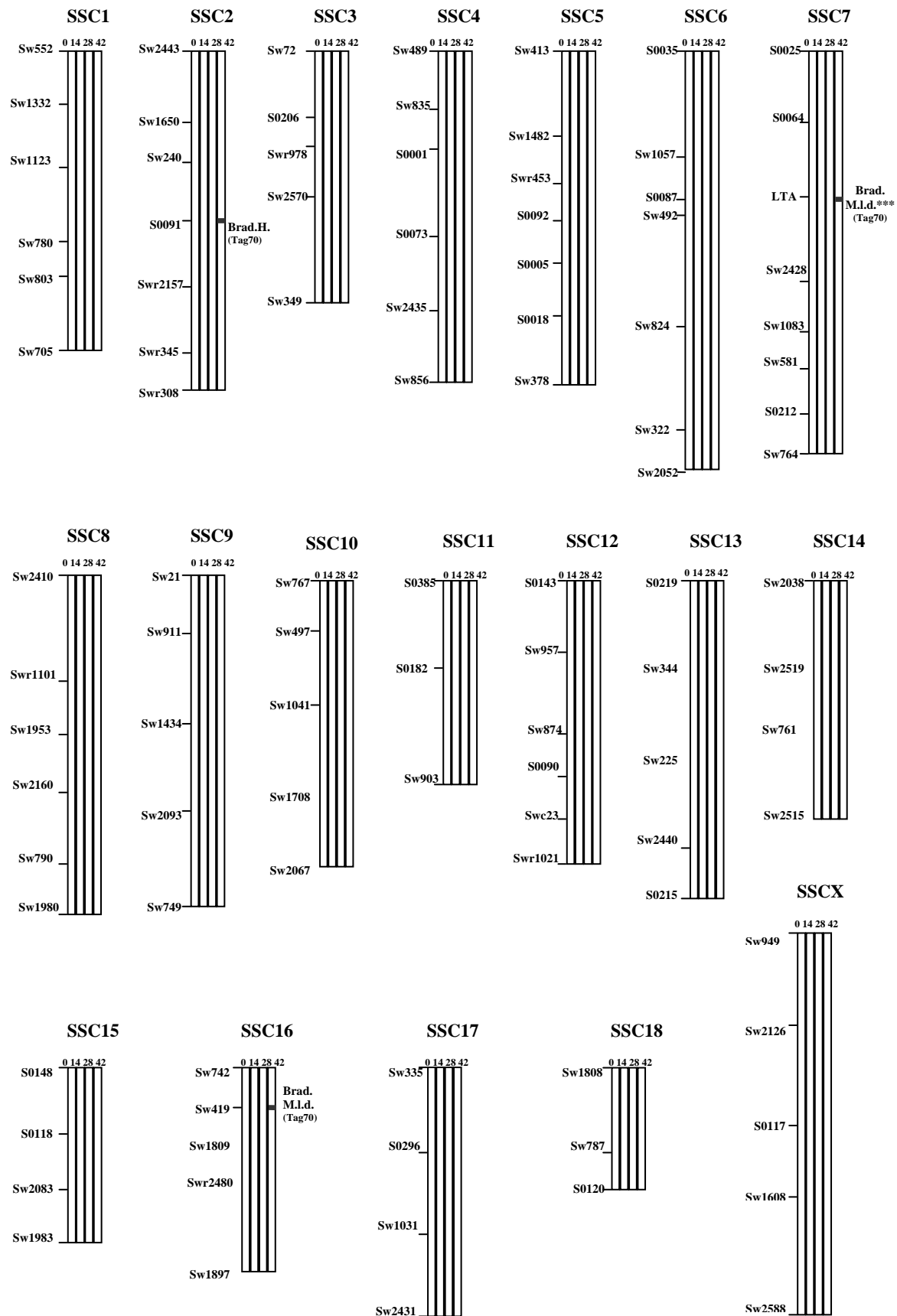


Abbildung 17: QTL für die Anzahl Bradyzoiten im M.l.d. (Brad. M.l.d.) bzw. in der Herzmuskulatur (Brad. H.).

Die QTL für die Zahl der Bradyzoiten im M.l.d. und für die IgG₂-Spiegel an Tag 42 p.i. und Tag 28 p.i. erklärten mit 32,9 %, 23,4-29 % und 23,2 % die höchsten Varianzanteile.

Am Marker LTA konnte eindeutig der Zusammenhang zwischen reinerbigen Trägern der Pietrain-Allele und erhöhter Bradyzoitenzahl pro Gramm M.l.d. hergestellt werden (Abb. 18).

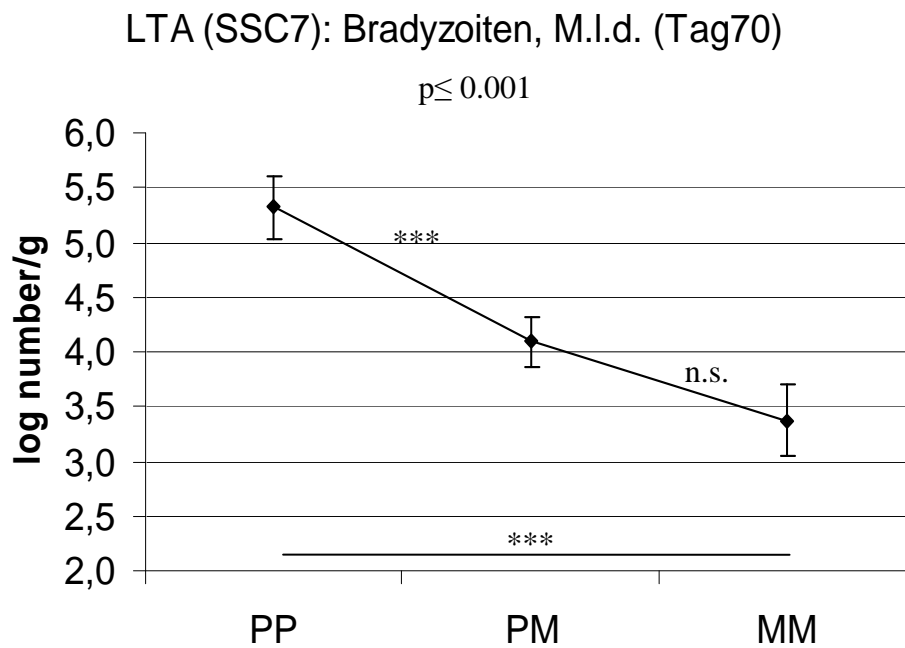


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Bradyzoitenzahl und Allelform am Marker LTA; P: Pietrainallel; M: Meishanallel; LTA: Lymphotoxin A; die Y-Achse repräsentiert die logarithmierte Zahl der Bradyzoiten pro Gramm M.l.d. am Tag 70 p.i.

4.3.6 QTL immunologischer Merkmale

Für die Immunglobulin-Titer von IgG, IgM, IgG₁ und IgG₂ konnten insgesamt sieben chromosomweit und vier genomweit signifikante QTL kartiert werden (Abb. 19). Für IgG-Titer konnten zwei QTL auf SSC5 ($F=6,51$) und SSC12 ($F=6,46$) kartiert werden. IgM-QTL konnten auf SSC5 ($F=5,55$), SSC12 ($F=6,26$) und SSC13 ($F=6,93$) kartiert werden.

Genomweit signifikante QTL wurden auf SSC4 für IgG₁-Titer (d42; $p<0,01$; $F=8,87$) und auf SSC7 (d42; $p<0,001$; $F=20,92$), SSC17 (d42; $p<0,001$; $F=15,61$) und SSCX (d28; $p<0,001$, $F=15,02$) für IgG₂-Titer kartiert. Die beiden genomweit signifikanten QTL für IgG₂ an Tag 42 auf den Chromosom 7 und 17 erklärten zusammen 52,4% der F_2 -Varianz für dieses Merkmal. Der QTL auf Chromosom 7 mit einem F-Wert von 20,92 ist zugleich der ausgeprägteste QTL dieser Untersuchung und wurde im Bereich des Markers Sw764 lokalisiert (Abb. 17). Der genomweit signifikante QTL für IgG₂-Titer an Tag 28 p.i. mit einem F-Wert von 15,02 konnte auf dem X-Chromosom in der Nähe des Markers Sw1608 kartiert werden.

In den Abbildungen 20 bis 22 werden die Zusammenhänge zwischen IgG₂-Spiegeln und Allelsituation am entsprechenden Marker graphisch dargestellt. Pietrainallele auf SSC7 führten zu verringerten IgG₂-Spiegeln (Abb. 21). Pietrainallele auf SSC17 (Abb. 22) und SSCX (Abb. 20) führten hingegen zu einem Anstieg.

Tiere, die am Marker Sw764 reinerbig Meishanallele trugen, waren mit hohen IgG₂-Antikörperspiegeln assoziiert (Abb. 21).

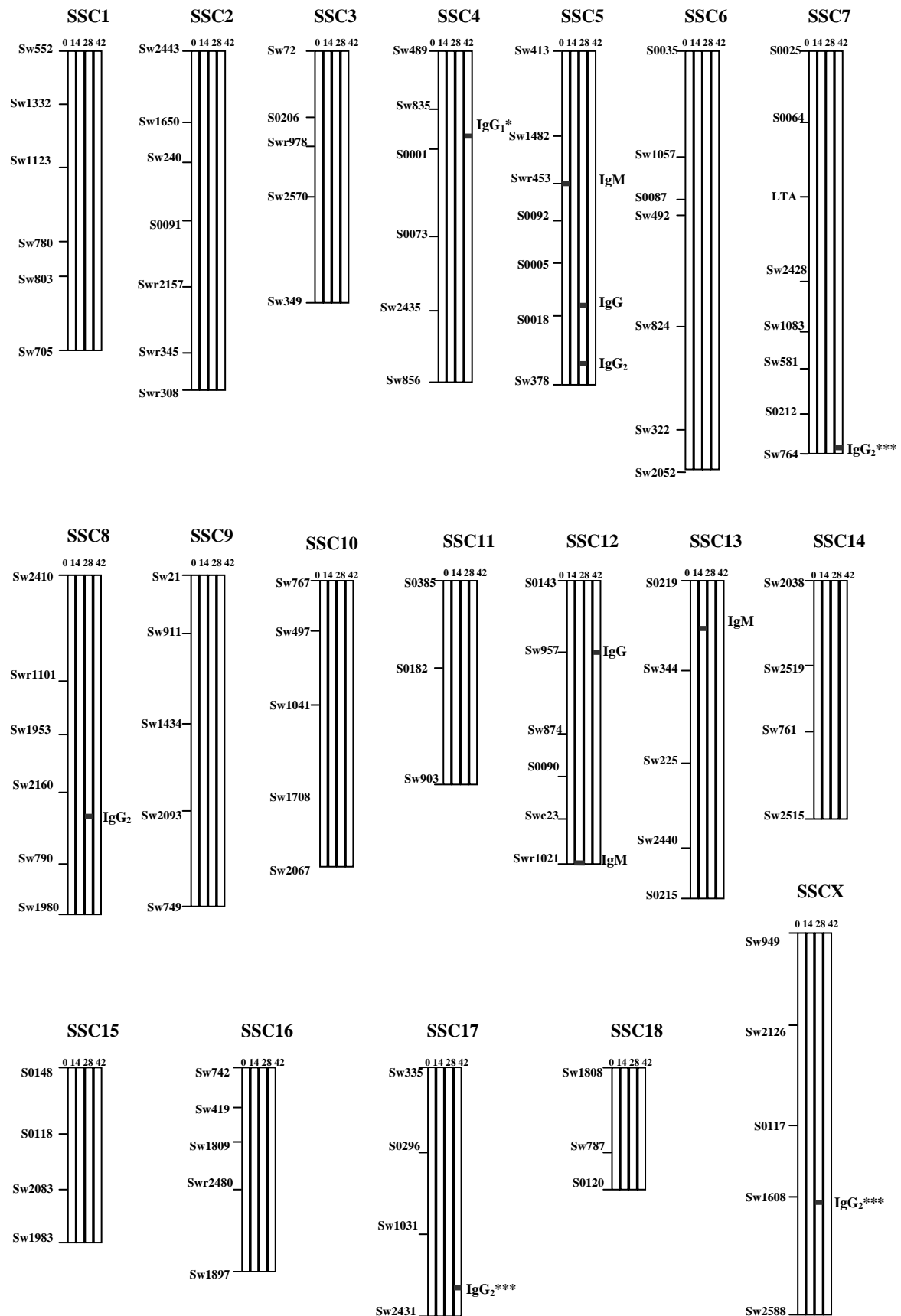


Abbildung 19: QTL immunologischer Merkmale

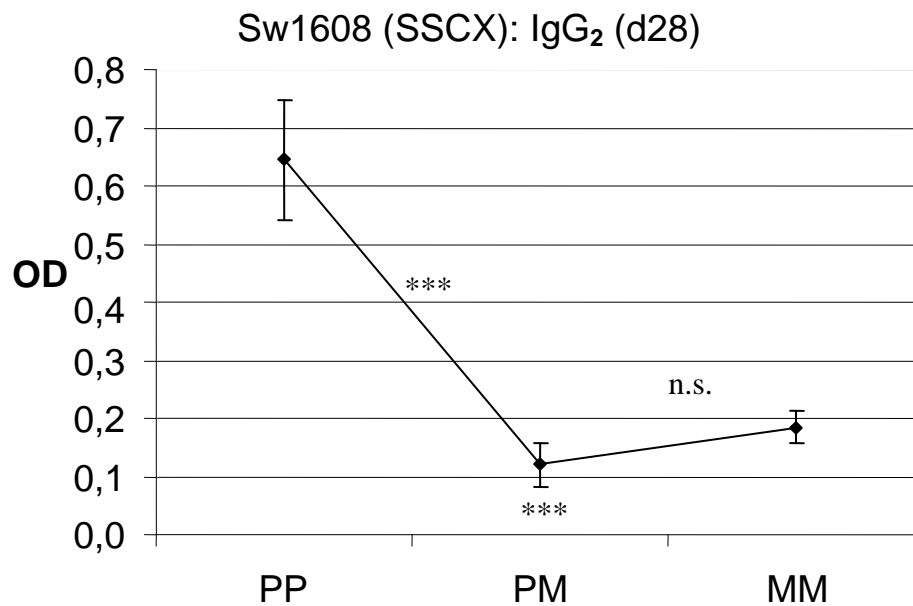


Abbildung 20: Assoziation zwischen Pietrainallel und hohen IgG₂-Titern an Tag 28 p.i. am Marker Sw1608; die drei möglichen Genotypen sind aufgezeigt (P = Pietrain; M = Meishan); *** $p \leq 0.001$; n.s. = nicht signifikant.

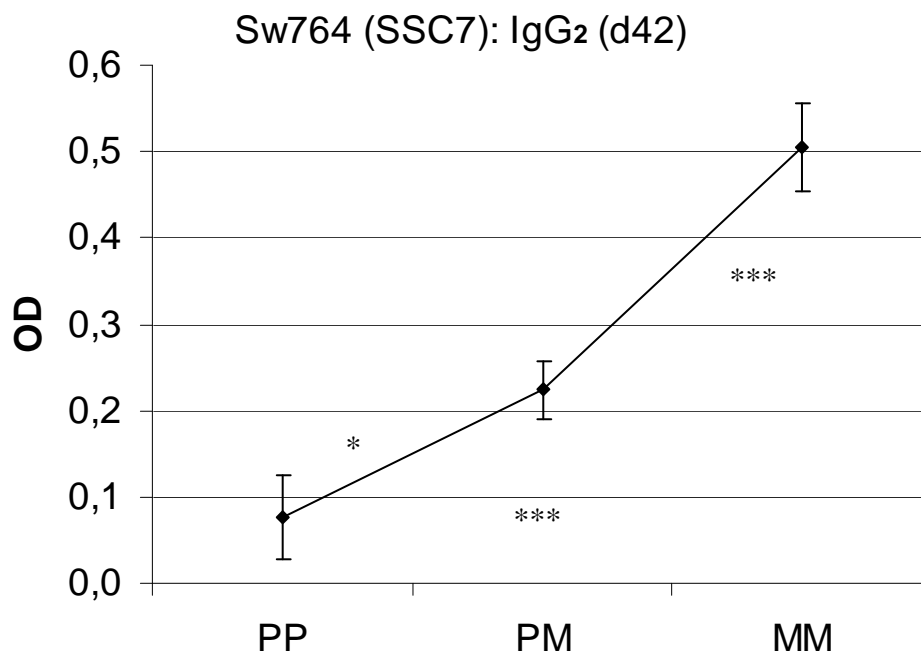


Abbildung 21: Assoziation zwischen Meishanallel und hohen IgG₂-Titern an Tag 42 p.i. am Marker Sw764; die drei möglichen Genotypen sind aufgezeigt (P = Pietrain; M = Meishan); * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

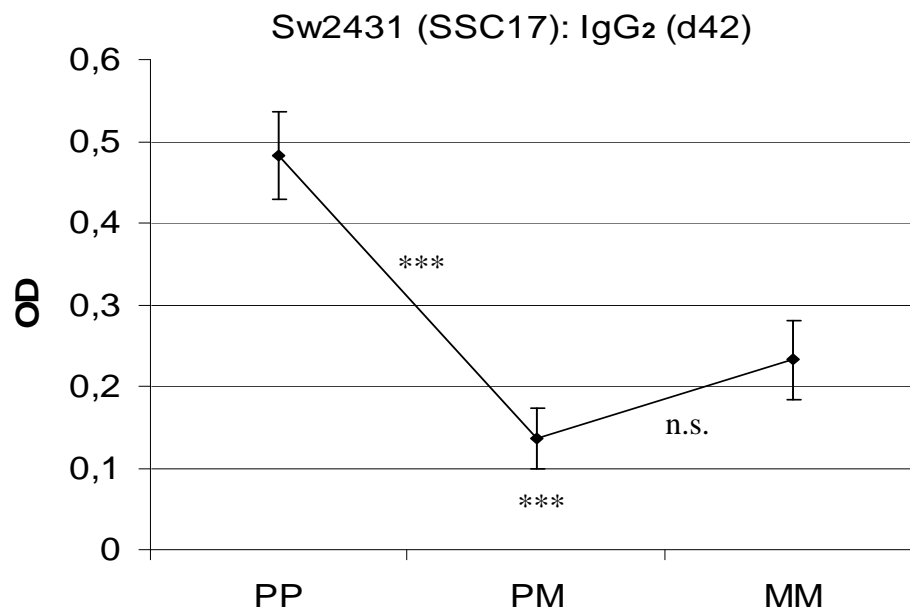


Abbildung 22: Assoziation zwischen Pietrainallel und hohen IgG₂-Titern an Tag 42 p.i. am Marker Sw2431; die drei möglichen Genotypen sind aufgezeigt (P = Pietrain; M = Meishan); *** $p \leq 0.001$; n.s. = nicht signifikant.

5. Diskussion

5.1 Klinische Merkmale (Rektaltemperatur und Herzfrequenz)

Aus klinischer Sicht lässt sich die Sarkozystose in eine akute und eine chronische Phase unterteilen (DUBEY et al., 1989). Die akute Sarkozystose ist vornehmlich durch hohes Fieber zum Zeitpunkt der zweiten Schizogonie gekennzeichnet. Die chronische Sarkozystose kann in ihrer Schwere durch die Anzahl der Bradyzoiten pro Gramm Muskelgewebe charakterisiert werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden klinische Merkmale unter physiologischen Bedingungen sowie unter akuter und chronischer Sarkozystose und während der Rekonvaleszenz verglichen. Die Infektionsdosis war so gewählt, dass die klinischen Symptome während der akuten Sarkozystose nur mild ausfielen (ERBER & GEISEL, 1979; DAUGSCHIES et al., 1987, 1988).

Resistenzunterschiede gegenüber *S. miescheriana* zeigten sich in der gemessenen Rektaltemperatur zum Zeitpunkt der zweiten Schizogonie und mit dem Beginn der chronischen Muskelpfase in der sechsten Woche p.i.. Körpertemperaturanstiege während der akuten und chronischen Sarkozystose gingen mit abnehmenden Herzfrequenzen einher (REINER et al., 2002a). Nach Berechnungen von HEPP (2006) waren die Heritabilität der Rektaltemperaturen nur gering bis mäßig, die der Herzfrequenzen dagegen mittel bis hoch.

Insgesamt zehn QTL von geringerer Bedeutung beeinflussen die Rektaltemperatur, darunter sechs QTL an Tag 14 p.i. und zwei QTL an Tag 42 p.i.. Die QTL erklären zusammen 69,3 % der F₂-Varianz an Tag 14 p.i. bzw. 35 % an Tag 42 p.i.. Der QTL mit der größten Bedeutung liegt auf Chromosom 2 für die Rektaltemperatur an Tag 14 p.i. (F = 10,42). Dieser QTL befindet sich in einer Region auf SSC2, die auch im Zusammenhang mit erhöhter Körpertemperatur nach Infektion mit dem *Pseudorabiesvirus* (PrV; α -Herpes-Virus) stand (REINER et al., 2002b). Die chromosomale Region beinhaltet ein Interleukin-Cluster mit Genen für IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-12. Pietrain-Allele konnten mit niedrigeren Rektaltemperaturen assoziiert werden, was eventuell als Hinweis auf eine verminderte Immunantwort gedeutet werden könnte. Der mit Meishan-Allelen einhergehende raschere und umfassendere Temperaturanstieg zeigt sich mit einer besseren Abwehr gegenüber *S. miescheriana* und in Folge mit einem geringeren Befall der Muskulatur mit Bradyzoiten. Ein weiterer QTL, der mit der Region eines QTL für Resistenz gegen PrV zusammenfällt, wurde auf SSC11 kartiert (Marker SO182 - Sw903). Dieser ist mit einem F-Wert von 6,02 aber nur

chromosomweit signifikant. Eine dritte, zum *PrV*-Modell homologe Region, liegt auf SSC16. Pietrain-Allele an diesem QTL zeigten sich mit höherer Rektaltemperatur während der akuten Phase der Infektion und mit höheren Bradyzoitengehalten in der Muskulatur assoziiert. Für mögliche Kandidatengene in diesem Bereich gibt es bisher keine Hinweise.

Im Gegensatz zur Rektaltemperatur sind alle QTL für die Herzfrequenz lediglich chromosomweit signifikant ($F \geq 5,5-8,2$). Sechs QTL wurden für die Herzfrequenz an Tag 14 p.i. kartiert. Sie erklären zusammen 69,8 % der phänotypischen Varianz. Drei QTL an Tag 42 p.i. erklären zusammen 45 % der F_2 -Varianz. Einzeln betrachtet, sind diese QTL jedoch von eher geringer Bedeutung.

Im Vergleich der klinischen Merkmale untereinander sind die Effekte der QTL für die Herzfrequenz am größten. In der Addition konnten unter allen Merkmalsbereichen die höchsten kumulativen Varianz-Anteile für die klinischen Merkmale Herzfrequenz und Rektaltemperatur während der akuten Sarkozystose erklärt werden (69,8 bzw. 69,3 %). Die absolute Summe der Varianzanteile mehrerer QTL für ein Merkmal dürfte allerdings überschätzt sein, da die QTL nicht vollständig unabhängig voneinander sind. Da die klinischen Merkmale von mehreren QTL mit geringen Einzeleffekten beeinflusst werden, dürfte eine MAS für diese Merkmale zur Verbesserung der Krankheitssituation in Schweinebeständen nicht in Frage kommen. Quantitativ genetische Modelle könnten hier eher Erfolg versprechen.

5.2 Klinisch-chemische Merkmale

Bezüglich der betrachteten klinisch-chemischen Merkmale unterscheiden sich die Founderrassen Pietrain und Meishan sowohl vor der Infektion als auch während der verschiedenen Phasen der Sarkozystose signifikant. Diese Unterschiede sind in hohem Maße erblich (HEPP, 2006). Das trifft v.a. für die AST- (früher GOT) und CK-Werte zu (REINER et al., 2002a). Die Werte der F_2 -Tiere lagen meist intermediär zu denen der Ausgangsrassen. Die Parameter Aktivitäten der AST und der CK wurden ausgewählt, weil sie sich gut für die Beurteilung des Zustandes von Leber und Muskulatur eignen, die während der akuten und chronischen Sarkozystose besonders in Mitleidenschaft gezogen sind. Um beurteilen zu können, welches Organ vornehmlich geschädigt worden ist, bedient man sich des Quotienten aus CK und AST (CK/AST). Da CK ein muskelspezifisches Enzym und AST nicht organspezifisch ist, deutet z.B. ein Quotient >20 eine Muskelzellschädigung an. Hingegen

sprechen Quotienten <20 eher für eine Leberzellschädigung. Insgesamt konnten neun chromosomweit signifikante und vier genomweit signifikante QTL mit Assoziation zu AST- und CK-Werten bzw. zum ermittelten Quotienten CK/AST kartiert werden. Ein genomweit signifikanter QTL für die AST an Tag 42 p.i. konnte auf SSC10 im Markerintervall Sw1708 / Sw2067 kartiert werden. Dort liegt unter anderem das Gen, das für das Enzym Aspartat-Amino-Transferase (AST) kodiert. Dieser Befund spricht dafür, dass eine Genvariante direkt in der AST für die unterschiedliche Merkmalsausprägung des Enzyms verantwortlich sein könnte (cis). Pietrain-Allele konnten mit geringeren AST-Werten vor der Infektion bzw. während der akuten Sarkozystose und mit überdurchschnittlich höheren Werten während der chronischen Sarkozystose assoziiert werden.

Auf SSC1, SSC6 und SSC8 konnte je ein genomweit signifikanter QTL für den CK-Wert und den Quotienten aus CK/AST kartiert werden. Die Region auf SSC1 beinhaltet Gene, die für eine mitochondriale Kreatinkinase-Isoform kodieren (CICERA et al., 2003). Gene im Bereich des QTL auf SSC6 kodieren für eine muskelspezifische Isoform der Kreatinkinase (DAVOLI et al., 2002).

5.3 Hämatologie

Einige QTL konnten für Merkmalsvariabilitäten des Blutbildes berechnet werden. Dies sind im Einzelnen QTL für die Zahl der Lymphozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Thrombozyten. In der Dissertation HEPP (2006) wurden für diese Merkmale nur mäßige Heritabilitäten angegeben. Die größten Werte wurden für den Zeitraum der chronischen Sarkozystose beschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden nur QTL für die Eosinophilen- und Thrombozytenzahl beurteilt, da diese beiden Parameter für die Charakterisierung einer parasitären Infektion von größerer Bedeutung sind. Für die übrigen hämatologischen Werte wird auf das Dissertationsvorhaben FISCHER verwiesen.

Insgesamt konnten für hämatologische Merkmale (Eosinophile und Thrombozyten) sechzehn chromosomweit signifikante und drei genomweit signifikante QTL kartiert werden. Die relativ große Anzahl und die Verteilung der QTL auf den Chromosomen sprechen für einen polygenen Charakter dieser Merkmale. Assoziationen zwischen kartierten QTL und potentiellen homologen Kandidatengenen konnten kaum hergestellt werden. Um die der Merkmalsvarianz zugrunde liegenden Regulations- und Interaktionsmechanismen auf genetischer Ebene aufklären zu können, werden noch detailliertere immunologische Studien

notwendig sein. Für die Nutzung der markergestützten Selektion (MAS) fehlen die notwendigen herausragenden QTL. Allerdings könnten die Merkmale auch hier theoretisch durch Methoden der quantitativen Genetik verbessert werden.

5.4 Bradyzoitenzahl im Muskelgewebe

Unterschiede zwischen den Rassen Pietrain und Meishan in der Bradyzoitenzahl pro Gramm Muskelgewebe nach *S. miescheriana*-Infektion sind zum erheblichen Teil genetisch determiniert (REINER et al., 2002; HEPP, 2006).

Der ausgeprägteste QTL für die Bradyzoitenzahl im M.l.d. liegt auf Chromosom 7 im Bereich LTA (Lymphotoxin A) und Sw2428. In dieser Region befinden sich die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und der Tumornekrosefaktor (TNF). Der QTL ist der zweitausgeprägteste QTL dieser Untersuchung ($F=17,39$) (Abb. 16). Wechselbeziehungen zwischen Variationen im MHC und der Empfindlichkeit gegenüber Infektionserkrankungen sind bereits bekannt (VAIMAN et al., 1998). Über Zusammenhänge zwischen MHC und Resistenz beim Schwein berichteten MADDEN et al. (1990). Dabei geht es um die Resistenz gegenüber der Trichinellose. Gene des MHC sind damit in höchstem Maße Kandidatengene, die sich an den von REINER et al. (2002) und HEPP (2006) beobachteten Unterschieden der Rassen Pietrain und Meishan hinsichtlich der Resistenz gegenüber einer *S. miescheriana*-Infektion beteiligen könnten. Allerdings liegen auf diesem Chromosomenabschnitt noch andere Gene, die mit der Immunantwort gegenüber Krankheitserregern assoziiert sein können, wie z. B. Gene des TNF- α (JANSSEN et al., 2002; GIESE et al., 2004). Die Größe des QTL korrelierte gut mit der für dieses Merkmal berechneten Heritabilität von 0,68 (HEPP, 2006). Ein zweiter QTL für dieses Merkmal konnte auf Chromosom 16 im Bereich des Markers Sw419 ($F=6,2$) kartiert werden. Hinweise auf mögliche Kandidatengene in diesem Chromosomenabschnitt ergaben sich bisher nicht.

Beide QTL erklären zusammen 44,6 % der phänotypischen Varianz der F_2 -Tiere für die Bradyzoitenzahl im M.l.d.. In beiden Fällen ist eine erhöhte Bradyzoitenzahl mit Pietrain-Allelen assoziiert.

5.5 Immunglobuline

Der markanteste QTL dieser Untersuchung wurde auf Chromosom 7 für IgG₂-Spiegel an Tag 42 p.i. kartiert (Abb. 16). Mit einem F-Wert von 20,92 erklärt dieser QTL allein 29 % der phänotypischen Varianz der F₂-Tiere. Er weist den größten F-Wert der gesamten Untersuchung auf und ist auf SSC7 am telomerischen Ende des langen Armes im Bereich des Markers Sw764 lokalisiert. In dieser Region liegt ein Gencluster für die schwere Seitenkette der Immunglobuline (immunglobulin heavy chain gene cluster). Damit lässt sich ein Zusammenhang zwischen QTL und mutmaßlichen Kandidatengenen herstellen. Auch in diesem Fall könnte also eine Variante im Gen selbst (cis) für die Variabilität dessen Produkts (IgG₂-Spiegel) verantwortlich sein (cis acting). Nach Untersuchungen von TASHITA et al. (1998) kann eine Mutation im homologen Chromosomenabschnitt beim Menschen (Chromosom 14q32.33), im Gen für die schwere Kette Gamma-2 (Immunglobulin heavy chain gamma-2 gene), zu einem Mangel an IgG₂ und IgA führen, wodurch die Krankheitsanfälligkeit erhöht wird. In der Arbeit von HEPP (2006) konnte für den IgG₂-Spiegel an Tag 42 p.i. eine relativ hohe Heritabilität ($h^2=0,42$) berechnet werden.

Ein weiterer QTL für IgG₂-Spiegel an Tag 42 p.i. konnte auf Chromosom 17 im Bereich zwischen den Markern Sw1031 und Sw2431 kartiert werden. Dieser QTL erklärt 23,4 % der phänotypischen F₂-Varianz ($F=15,6$; $p \leq 0,001$). Beide genomweit signifikanten QTL erklären zusammen 52,4 % der IgG₂-Varianz der F₂-Tiere.

Ein QTL für das Merkmal IgG₂-Spiegel an Tag 28 p.i. konnte auf dem X-Chromosom lokalisiert werden ($F=15,02$; $p \leq 0,001$). In der homologen Region auf dem menschlichen X-Chromosom liegen Gene, die für Teile des IL-2 Rezeptors kodieren. NEUBERT et al. (2005) beschrieben, dass eine Mutation in diesem Gen zum sogenannten schweren kombinierten Immundefekt (SCID) führt.

Hinweise auf die Rolle von Immunglobulinen für die Abwehr von Parasiten finden sich bei JÄKEL et al. (2001). So induziert die akute Infektion mit *Sarcocystis spp.* bei der Ratte eine Th1-Zell-gesteuerte Antikörperantwort. Diese ist durch einen frühen Anstieg von IFN- γ , die Elimination von Zellparasiten durch aktivierte Makrophagen, durch Reaktionen zytotoxischer Zellen und die Produktion von IgG₂ und IgM charakterisiert (ZINKERNAGEL, 1998). Dem IgG₂-Anstieg folgt ein IgG₁-Anstieg während der chronischen Phase der Infektion. Die Erklärung stützt sich auf die Interaktion zwischen Immunglobulinen und den zwar verwandten, jedoch unterschiedlichen Antigenen der Sporozoiten und Bradyzoiten (JÄKEL et al., 1999).

Beim Schwein bezeichnet man IgG₁ als Typ-2-Isotyp. Der Typ-2-Isotyp wird durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 gesteigert. IgG₂ ist ein Typ-1-Isotyp, vornehmlich verstärkt durch IFN- γ und IL-12 (CRAWLEY et al., 2003). Dabei scheint IL-12 der wichtigste Auslöser für die IFN- γ Synthese zu sein (O'GARRA, 1998). FRONTERA et al. (2003) schrieben IgM und IgG₁-Isotypen eine wichtige Rolle für die erworbene Resistenz gegenüber den wandernden Larvenstadien von *Ascaris suum* zu. Dies gilt allerdings nur für Schweine, die für Helminthen naiv sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Vermutung, dass insbesondere IgG₂ eine wichtige Rolle in der Abwehr von *S. miescheriana* zu spielen scheinen. Pietrainallele auf SSC7 waren mit verringerten, Allele auf SSC17 und SSCX mit gesteigerten IgG₂-Spiegeln assoziiert. Eine frühe IgM-Antwort wurde durch Pietrainallele an drei mutmaßlichen QTL auf den Chromosomen SSC5, SSC12 und SSC13 negativ beeinflusst. Ein früher IgM-Anstieg, zeitgleich mit einem IgA-Anstieg nach Infektion mit Toxoplasmen wurde für Nager (GODARD et al., 1990) und nach Infektion mit *S. miescheriana* beim Schwein (REINER et al., 2006) beschrieben. Die IgM-Titer an Tag 21 p.i. unterschieden sich nach der Infektion mit *S. miescheriana* signifikant zwischen den Meishan und Pietrain, wobei hohe IgM-Spiegel mit geringerem Befall des M.l.d. mit Brayzoiten korrelierten.

5.6 Fazit

Vor dem Hintergrund der weltweiten Verbreitung des Parasiten und der sich daraus ergebenden ökonomischen Bedeutung könnte die Aufklärung der ursächlichen Genvarianten einen wertvollen Ansatz zum Verständnis und zur Bekämpfung der Sarkozystose darstellen. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse einen Informationsgewinn hinsichtlich der beteiligten Pathogenese- und Abwehrmechanismen erwarten.

Bei Nutztieren gewinnt die Selektion auf Krankheitsresistenz zunehmend an Bedeutung. Der Verbraucher verlangt nach sicheren Lebensmitteln aus einer Produktion mit minimalem Medikamenteneinsatz und frei von Zoonose-Erregern. Der Tierhalter hat neben der Produktion sicherer Lebensmittel das Bestreben, seine betrieblichen Einbußen durch Infektionskrankheiten so gering wie möglich zu halten.

In Zukunft könnten neue Prophylaxe-Verfahren, die auf der Nutzung der genetischen/natürlichen Krankheitsresistenz basieren, im Bereich der Nutztierzucht etabliert werden. Bisher beschränkt sich die kommerzielle Nutzung der Krankheitsresistenz beim Schwein im Wesentlichen auf Resistenzen gegen die durch F18- und F4-Fimbrien tragenden *E. coli*-Stämme ausgelöste Colienterotoxämie (VÖGELI et al., 1997) und Colidiarrhoe (JORGENSEN et al., 2003). In Canada werden außerdem kommerzielle Linien auf gesteigerte Immunantwort selektiert (WILKIE & MALLARD, 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse belegen in eindringlicher Weise, dass auch polygen eingestufte Merkmale der Krankheitsresistenz durch wenige, herausragende und damit selektierbare QTL bedingt sein können. Die Untersuchung liefert zugleich Ansatzpunkte für die Möglichkeit, dass solche QTL nicht nur für die Resistenz gegenüber einem bestimmten Erreger, sondern gegenüber einer Reihe von Erregern oder Erregergruppen verantwortlich sein könnten. Hieraus ergibt sich ein enormes Potential der Nutzung der genetischen Krankheitsresistenz in der Prophylaxe der Zukunft.

6. Zusammenfassung

Entstehung und Ausgang von Infektionskrankheiten bei Wirbeltieren sind zumindest zu einem gewissen Grad genetisch determiniert. Dies wurde durch verschiedene Publikationen untermauert. In den meisten Fällen allerdings sind die beim Wirt phänotypische Variationen auslösenden Genvarianten nicht bekannt. Zysten bildende Kokzidien der Gattung *Sarcocystis* sind häufig vorkommende Parasiten bei Nutztieren. *Sarcocystis* (*S.*) *miescheriana* ist ein einzelliger Parasit, der bei anfälligen Schweinen, die als Zwischenwirt dienen, ein akutes und chronisches Krankheitsbild verursachen kann. Meßbare Unterschiede in der Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber *S. miescheriana* wurden zwischen den Rassen Meishan und Pietrain festgestellt. Jüngste Untersuchungen haben den Beweis für mittlere bis hohe Erblichkeiten dieser die Unterschiede bedingenden Faktoren geliefert und haben damit den Grundstein für die Suche nach den verantwortlichen Genorten gelegt.

Ein möglicher erster Schritt zur Identifikation der kausalen Genorte und deren Varianten kann die Kartierung von Quantitative trait loci (QTL) sein. In informativen Familien können segregierende Markerallele dazu dienen, mittels QTL-Analyse Assoziationen zwischen chromosomalen Regionen und phänotypischer Variabilität festzustellen. Für die Resistenz/Empfindlichkeit von landwirtschaftlichen Nutztieren gegenüber parasitären Infektionserregern wurden bereits QTL für Kokzidienresistenzen beim Wirtschaftsgeflügel, Trypanosomentoleranzen beim Rind und Nematodenresistenzen beim Schaf gefunden.

Für die vorliegende Studie wurden 101 informative von insgesamt 150 Mikrosatelliten genotypisiert. Der durchschnittliche Abstand der Marker untereinander betrug 25,2 cM. Diese Untersuchung repräsentiert die erste QTL-Studie zu Resistenzen gegenüber einer Parasitose beim Schwein.

Die QTL-Kartierung wurde in einer Pietrain/Meishan-Familie mit 139 F₂-Schweinen, die experimentell mit 50.000 Sporozysten von *S. miescheriana* im Alter von ca. 100 Tagen oral infiziert wurden, durchgeführt. Die eingesetzte, geringe Infektionsdosis rief das typische klinische Bild hervor, jedoch mit mildem Verlauf. Die erhobenen klinischen, klinisch-chemischen, hämatologischen, immunologischen und parasitologischen Merkmalsdaten dienten zur phänotypischen Beschreibung der Tiere.

Die QTL-Analyse wurde mit der online-Anwendung „QTL-Express“ durchgeführt. Die F-Wert-Schwellen wurden für genomweite Signifikanz auf 14,0 ($p \leq 0.001$), 11,2 ($p \leq 0.01$),

und 8,2 ($p \leq 0.05$) geschätzt. Die F -Schwelle für chromosomweite Signifikanz war 5,5 ($p \leq 0.05$).

Insgesamt konnten für klinische, klinisch-chemische, hämatologische, immunologische und parasitologische Merkmale 56 QTL auf verschiedenen Chromosomenregionen kartiert werden. Darunter 14 genomweit signifikante QTL ($F \geq 8.2$) und 42 chromosomweit signifikante (mutmaßliche) QTL ($F \geq 5.5$). Bedeutsame QTL wurden auf den Chromosomen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 17, und X kartiert.

Zehn und vierzehn QTL wurden für die Rektaltemperatur bzw. für die Herzfrequenz gefunden. Diese klinischen Merkmale wurden von vielen QTL mit nur kleinen Einzeleffekten beeinflusst. Dreizehn QTL konnten mit den klinisch-chemischen Merkmalen wie den Serumenzymen CK und AST assoziiert werden. Die Pietrain- und Meishan-Schweine zeigten sowohl vor als auch während der Infektion signifikant unterschiedliche CK- und AST-Werte. Die untersuchten Parameter des Blutbildes wurden von neunzehn QTL kontrolliert. Zehn QTL für die Thrombozyten- und neun QTL für die Eosinophilenzahl. Potentielle homologe Kandidatengene im Bereich dieser QTL wurden kaum festgestellt.

Ein Hauptaspekt bezüglich der genetisch bedingten Unterschiede für die Resistenz/Empfindlichkeit zwischen den Ausgangsrassen Meishan und Pietrain stellte die Zahl der Bradyzoiten pro Gramm Muskelgewebe dar. Drei QTL für die Bradyzoitenzahl wurden auf SSC7 (musculus longissimus dorsi, M.l.d.; $p < 0.001$), SSC16 (M.l.d.) und SSC2 (Herzmuskel) kartiert. Die QTL auf SSC7 und SSC16 erklärten zusammen 44,7% der merkmalspezifischen F_2 -Phänotypvarianz. In allen Fällen zeigten sich Pietrainallele assoziiert mit höheren Bradyzoitenzahlen. Der QTL auf SSC7 ist der deutlichste für die Bradyzoitenzahl ($F = 17.4$), kartiert im Bereich des Markers LTA (lymphotoxin A). Diese Region beinhaltet Gengruppen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) und des Tumornekrosefaktors (TNF). Zusammenhänge zwischen Unterschieden im MHC und unterschiedlichen Krankheitsempfindlichkeiten sind schon länger bekannt. TNF ist ein Zytokin, welches entscheidend an der Modulation des Immunsystems und der Zellteilung verschiedenster Zelltypen beteiligt ist.

Einige QTL für immunologische Merkmale wie IgM, IgG, IgG₁, und IgG₂ konnten kartiert werden. Der bedeutsamste QTL in der vorliegenden Untersuchung wurde für IgG₂-Titer an Tag 42 post infectionem ($F = 20.9$) auf SSC7, am telomerischen Ende des langen Armes kartiert. Dieser QTL im Bereich des Markers Sw764 erklärte allein 29% der IgG₂-Varianz an Tag 42. Die Chromosomenregion des QTL beinhaltet das Immunglobulin heavy chain gene cluster. Diese Tatsache erklärt, dass Variationen der IgG₂-Titer mit hoher Wahrscheinlichkeit

direkt Allelvariationen der Gene, die für IgG₂-Antikörper kodieren, zuzuschreiben sind (*cis-acting*).

Zusammenfassend betrachtet, weisen die bedeutsamsten QTL in der akuten und chronischen Sarkozystose darauf hin, dass die Unterschiede in der Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber dieser Erkrankung beim Schwein genetisch bedingt sind. Besonders die QTL für Bradyzoitenzahl und IgG₂-Titer auf Chromosom 7 entsprechen in ihrer Größe QTL für Leistungsmerkmale, die bereits in die Züchtung integriert werden konnten.

In der relativ großen Zahl an kartierten QTL mit großen Einzeleffekten spiegelt sich die Komplexität der Erreger-Wirts-Interaktionen wider. *S. miescheriana* steht in dieser Untersuchung exemplarisch auch für andere Parasiten, sodass die Ergebnisse einen wertvollen Ansatz zum Verständnis anderer Erreger-Wirts-Interaktionen darstellen können.

Der positionelle Bezug einiger QTL zu physiologischen Kandidatengenen, wie z.B. Bradyzoiten und MHC/TNF bzw. IgG₂ und Immunglobulin heavy chain gene cluster, ermöglicht die Definition von Kandidatengenen, die im Konsens zur Aufklärung molekularer Grundlagen in der Resistenz/Empfindlichkeit des Schweines gegenüber *S. miescheriana* beitragen. Der Nachweis der für die gefundenen herausragenden QTL verantwortlichen Gene wird das Hintergrundwissen über Erreger-Wirts-Interaktionen und besonders über Mechanismen der Erregerabwehr verbessern. Mit Hilfe marker-gestützter Selektionsverfahren (MAS) könnten die verantwortlichen Genvarianten künftig zur Verbesserung des Gesundheitsmanagements in der Schweineproduktion eingesetzt werden.

6. Summary

The development of infectious diseases in vertebrates is gradual under genetic control. This has been stated in various different publications. But in most cases the gene loci contributing to such phenotypic variations of the host are unknown. Cyst-forming coccidia of the genus *Sarcocystis* are among the most prevalent parasites of livestock animals. *Sarcocystis miescheriana* (*S. miescheriana*) is a protozoan parasite causing acute and chronic disease in susceptible pigs as an intermediate host. In swine marked differences in resistance/susceptibility to *S. miescheriana* have been described in studies between Chinese Meishan and European Pietrain pigs. Recent research has provided evidence that these differences are significantly heritable, providing the basis to search for responsible gene loci. One practicable start towards the identification of underlying genes and gene variants may be the mapping of quantitative trait loci (QTL). With alleles of marker loci segregating within informative families, QTL analysis correlates chromosomal regions with phenotypic variation. Concerning the resistance/susceptibility of farm animals to parasitic infections, QTL have been mapped for coccidia resistance in poultry, trypanotolerance in cattle, and intestinal nematode resistance in sheep.

For the present study 101 informative of 150 microsatellites were genotyped to give an average distance of 25.2 cM between them. The survey represents the first QTL study on resistance to parasitosis in pigs.

QTL mapping was performed in 139 F₂ pigs of a Meishan/Pietrain family challenged orally at the age of 100 days with 50.000 sporocysts of *S. miescheriana*. The low doseage produced the typical clinical picture with a mild form of the disease. Clinical, clinical-chemical, haematological, immunological and parasitological traits were surveyed to describe the animals phenotypes.

QTL analysis was performed using the web-based application “QTL-Express”. *F* values for genome-wide significance thresholds were estimated as approximately 14.0 ($p \leq 0.001$), 11.2 ($p \leq 0.01$), and 8.2 ($p \leq 0.05$). The *F* threshold for chromosome-wide significance was 5.5 ($p \leq 0.05$).

Altogether 56 QTL for clinical, clinical-chemical, haematological, parasitological, and immunological traits were mapped to several chromosomal areas, among them 14 genome-

wide significant QTL ($F \geq 8.2$) and 42 chromosome-wide significant (putative) QTL ($F \geq 5.5$). Major QTL were mapped on chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 17, and X.

Ten and thirteen QTL were found for rectal temperatures and heart rates, respectively. Clinical traits seem to be controlled by many QTL, each with only minimal effects. Thirteen QTL were associated with clinical-chemical traits like serum enzymes CK and AST. Pietrain and Meishan pigs differed significantly in serum AST and CK levels before and during infection. The included haematological traits were controlled by nineteen QTL: Ten QTL for platelets and nine QTL for numbers of eosinophils. Potential homologous candidate genes were hardly detectable in the areas of these QTL.

One major aspect of the genetic difference in resistance between Meishan and Pietrain was the number of bradyzoites per gram of muscle tissue. Three QTL for bradyzoite numbers mapped to SSC7 (musculus longissimus dorsi, M.l.d.; $p < 0.001$), SSC16 (M.l.d.) and SSC2 (cardiac muscle). The QTL on SSC7 and SSC16 together explained 44.7% of the trait specific F_2 phenotypic variance. Pietrain alleles increased bradyzoite numbers. The QTL on SSC7 ($F = 17.4$) mapped to the marker range of LTA (lymphotoxin A), a region containing gene clusters of major histocompatibility complex (MHC) and TNF. Associations of MHC variability with disease susceptibility are already known and TNF is a proinflammatory cytokine, which mediates many immune functions and the growth of various cell types.

Several QTL were detected for immunological traits IgM, IgG, IgG₁, and IgG₂. The most prominent QTL of the present study was mapped for IgG₂ titers on day 42 post infection ($F = 20.9$) to SSC7, on the telomere of the long arm of the chromosome. Located in the range of marker Sw764, this QTL explained 29% of the IgG₂ variance on day 42. The region of the QTL contains the immunoglobulin heavy chain gene cluster. This fact indicates that variation in IgG₂ levels might be due to allelic variation directly within a gene coding for IgG₂ antibodies (*cis*-acting).

In conclusion, major QTL for the traits studied in the course of acute and chronic sarcocystosis suggest genetically based differences in resistance/susceptibility to the disease in swine. Especially the QTL for bradyzoite numbers and IgG₂ titers on SSC7 explain phenotypic variance ratios comparable to QTL already implemented in practical breeding for swine performance.

Relatively large numbers of QTL with major effects reflect the high complexity of host-parasite interaction. *S. miescheriana* used in this study stands exemplarily for other parasitoses, and the results might have a valuable impact on the understanding of other host-parasite interactions.

Positional associations of several of the QTL with physiological candidate genes like e.g., bradyzoites and MHC/TNF, IgG₂, and Ig heavy chain gene cluster, respectively, provide some candidate genes, which should lead to an elucidation of the molecular basis of resistance/susceptibility of pigs to *S. miescheriana*. Establishing the responsible genes and variants might help to improve our knowledge on host-parasite interactions, especially host defense mechanisms. Gene variants might be used for the improvement of herd performance in swine in the future.

7. Literaturverzeichnis

Abbott, A. (1990): A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* **402**: 715-720

Abbott, E. M., Parkins, J. J., Holmes, P. H. (1985): Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* **38**: 6-13

Al Bayati, H., Duscher, S., Koller, S., Rettenberger, G., Fries, R., Brenig, B. (1999): Construction and characterization of a porcine P1-derived artificial chromosome library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type I and type II loci. *Mamm. Genome* **10**: 569-572

Alexander, L. J., Troyer, D. L., Rohrer, G. A., Smith, T. P., Schook, L. B., Beattie, C. W. (1996a): Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mamm. Genome* **7**: 368-372

Alexander, L. J., Rohrer, G. R., Beattie, C. W. (1996b): Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Anim. Genet.* **27**: 137-148

Altfeld, E. (1988): Auswirkungen der akuten Sarkozystiose auf einige gerinnungsphysiologische Parameter beim Schwein. *Vet. Med. Diss.*, Hannover

Ammann, D., Vogel, B. (2000): Transgene Nutztiere: Landwirtschaft - Gene Farming - Klonen. Schweiz: *SAG-Studienpapier*: 1-49

Andersson, L. (2001): Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 130-138

Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-Lilja, I., Fredholm, M., Hansson, I., Hakansson, J., Lundstrom, K. (1994): Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* **263**: 1771-1774

Baker, R. L., Mwamachi, D. M., Audho, J. O., Aduda, E. O., Thorpe, W. (1999): Genetic resistance to gastro-intestinal nematode parasites in Red Maasai, Dorper and Red Maasai x Dorper ewes in the Sub-humid tropics. *Anim. Sci.* **69**: 335-344

Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. W., Ryan, A. M. et al. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet.* **6**: 227-235

Barrows, P. L., Prestwood, A. K., Adams, D. D., Dykstra, M. J. (1982b): Development of *Sarcocystis suicanis* ERBER, 1977 in the pig. *J. Parasitol.* **68**: 674-680

Barrows, P. L., Prestwood, A. K., Green, C. E. (1982a): Experimental *Sarcocystis suicanis* infections: disease in growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* **43**: 1409-1412

Barutzki, D., Erber, M., Boch, J. (1981): Möglichkeiten der Desinfektion bei Kokzidiose (Eimeria, Isospora, Toxoplasma, Sarcocystis). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **94**: 451-454

- Beh, K. J., Hulme, D. J., Callaghan, M. J., Leish, Z., Lenana, I., Windon, R. H., Maddox, J. F.** (2002): A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Anim. Genet.* **33**: 97-106
- Benacerraf, B., McDevitt, H.** (1972): Histocompatibility linked immune response genes. A new class of genes that controls the formation of specific immune response has been identified. *Science* **175**: 273-279
- Bertschinger, H. U., Stamm, M., Vögeli, P.** (1993): Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Vet. Microbiol.* **35**: 79-89
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S. L. F., Hawkins, G. A., Solinas-Toldo, S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., Beattie, C. W.** (1994): A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **136**: 619-639
- Blackwell, J. M.** (1996): Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infections and autoimmune disease susceptibility. *Mol. Med. Today* **2**: 205-211
- Boch, J., Hennings, R., Erber, M.** (1980): Die wirtschaftliche Bedeutung der Sarkosporidiose (*Sarcocystis suicanis*) in der Schweinemast. Auswertung eines Feldversuches. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **93**: 420-423
- Boch, J., Mannewitz, U., Erber, M.** (1978): Sarkosporidien bei Mastschweinen in Süddeutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **91**: 106-111
- Boguski, S., Schuler, G. D.** (1995): ESTablishing a human transcript map. *Nature Genet.* **10**: 369-371
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W.** (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-331
- Box, E. D., Duszynski, D. W.** (1978): Experimental transmission of *Sarcocystis* from icteric birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. *J. Parasitol.* **64**: 682-688
- Brade, W.** (2003): Neuere Erkenntnisse zur Domestikation und Genetik der Rinder. *Tierärztl. Umschau.* **58**: 241-251
- Brem, R. B., Yvert, G., Clinto, R., Kruglyak, L.** (2002): Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science* **296**: 752-755
- Brenig, B.** (2000): Analyse und Kartierung von Nutztiergenomen. 18. *Hülsenberger Gespräche. Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung.* **18**: 22-27
- Britten, R. J., Kohne, D. E.** (1968): Repeated sequences in DNA. *Science* **161**: 529-540
- Brown, J. F., Archibald, A. L.** (1995): Two porcine polymorphic microsatellite loci (S0033 and S0035). *Anim. Genet.* **26**: 277

- Cameron, H. S., Gregory, P. W., Hughes, E. H.**(1940): Studies on genetic resistance in swine to brucella infection. II. A bacterial examination of resistant stock. *Cornell Veterinarian* **31**: 21-24
- Cameron, H. S., Hughes, E. H., Gregory, P. W.,** (1942): Genetic resistance to brucellosis in swine. *J. Anim. Sci.* **1**: 106-110
- Campbell, E. M., Nonneman, D., Rohrer, G. A.** (2003): Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. *J. Anim. Sci.* **81**: 1706-1714
- Chardon, P., Nunes, M., Dezeure, F., Andres-Cara, D., Vaiman, M.** (1991): Mapping and genetic organization of the TNF genes in the swine Mhc. *Immunogenetics* **34**: 257-260
- Choi, J. K., Kim, S. C.** (2007): Environmental effects on gene expression phenotype have regional biases in the human genome. *Genetics. In Druck. PubMed*: PMID: 17237506
- Chowdhary, B. P., Rausepp, T., Fronicke, L., Scherthan, H.** (1998): Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. *Genome. Res.* **8**: 577-589
- Churchill, G. A., Doerge, R. W.** (1994): Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963-971
- Cicera, S., Jorgensen, C. B., Sawera, M., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Fredholm, M.** (2003): Comparative mapping in the pig: localization of 214 expressed sequence tags. *Mamm. Genome* **14**: 405-426
- Ciobanu, D. C., Lonergan, S. M., Bastiaansen, J. W. M., Woollard, J. R., Malek, M., Huff-Lonergan, E. J., Plastow, G. S., Rothschildt, M. F.** (2002): Evidence for new alleles in calpastatin gene associated with meat quality traits in pigs. *Proceed. 7th world congress on genetics applied to livestock production, Montpellier, France*, 10-11
- Cole, R. K.** (1968): Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Dis.* **12**: 9-28
- Coppieters, W. A., van de Weghe, A., Peelmen, L., Depicker, A., van Zeveren, A., Bouquet, Y.** (1993): Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. *Anim. Genet.* **24**: 163-170
- Crawley, A., Raymond, C., Wilkie, B. N.** (2003): Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**: 141-154
- Damriyasa, I.** (2001): Querschnittsstudie zu Parasitosen bei Zuchtsauen in südheissischen Betrieben. *Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen*
- Damriyasa, I., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A., M., Volmer, R., Zahner, H.** (2004): Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hessen, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.*, and *Neospora caninum* in sows. *Vet. Parasitol.* **126**: 271-286

- Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J. I., Soller, M.** (1993): Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated Genetic Map. *Genetics* **134**: 943-951
- Dauguschies, A.** (2004): Endoparasiten des Schweins: Bedeutung und Bekämpfung. *Tierärztl. Prax.* **32**: 335-338
- Dauguschies, A., Rommel, M., Schnieder, T., Henning, M., Kallweit, E.** (1987): Effects of *Sarcocystis miescheriana* infection on carcass weight and meat quality of halothane-tested fattening pigs. *Vet. Parasitol.* **25**: 10-31
- Dauguschies, A., Rommel, M., Schnieder, T., Henning, M., Kallweit, E.** (1988a): Effects of *Sarcocystis miescheriana* infection on carcass quality and on the water-binding capacity of the meat of halothane-tested fattening pigs. *Vet. Parasitol.* **27**: 231-237
- Dauguschies, A., Schnieder, T., Rommel, M.** (1988b): The effects of *Sarcocystis miescheriana* infections on blood enzymes and weight gain of stress-sensitive and stress-insensitive pigs. *Vet. Parasitol.* **27**: 221-229
- Dauguschies, A., Jacobs, M., Rommel, M.** (1989a): Herztod bei einem chronisch mit *Sarcocystis miescheriana* infiziertem Schwein – Ein Fallbericht – *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **102**: 184-187
- Dauguschies, A., Rommel, M., Hoppen, H. O.** (1989b): Prostanoids during acute sarcocystosis in growing pigs. *Parasitol. Res.* **76**
- Dauguschies, A., Altfeld, E., Rommel, M.** (1989c): The Hemostatic alterations in pigs fed sublethal doses of *Sarcocystis miescheriana*. *Vet. Parasitol.* **34**: 1-13
- Davies, G., Stear, M. J., Benothman, M., Abuagob, O., Kerr, A., Mitchell, S., Bishop, S. C.** (2006): Quantitative trait loci associated with parasite infection in Scottish blackface sheep. *Heredity* **93**: 252-258
- Davoli, R., Fontanesi, L., Zambonelli, P., Bigi, D., Gellin, J., Yerle, M., Milc, J., Bragila, S., Cenci, V., Cagnazzo, M., Russo, V.** (2002): Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig. *Anim. Genet.* **33**: 3-18
- Doss, S., Schadt, E. E., Drake, T. A., Lusi, A. J.** (2005): Cis-acting expression quantitative trait loci in mice. *Genome Res.* **15**: 681-691
- Drake, T. A., Schadt, E. E., Lusi, A. J.** (2006): Integrating genetic and gene expression data: application to cardiovascular and metabolic traits in mice. *Mamm. Genome* **17**: 466-479
- Dubey, J. P.** (1994): Toxoplasmosis. *J. Anim. Vet. Med. Assoc.* **205**: 1593-1598
- Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R.** (1989): Sarcocystosis of animals and man. *CRC Press, Boca Raton, Florida*

- Dubey, J. P., Weigel, R. M., Siegel, A. M., Thulliez, P., Kitron, U. D., Mitchel, M. A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N. E., Shen, S. K., Kwock, O. C., H., Todd, K. S.** (1995): Sources and Reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* **81**: 723-729
- Edfors-Lilja, I., Peterson, H., Gahne, B.** (1986): Performance of pigs with or without the intestinal receptor for *Escherichia coli* K88. *Anim. Prod.* **42**: 381-387
- Edfors-Lilja, I., Wattring, E., Magnusson, U., Fossum, C.** (1994): Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **40**: 1-16
- Edfors-Lilja, I., Wattring, E., Marklund, L., Moller, M., Andersson-Eklund, L., Andersson, L., Fossum, C.** (1998): Mapping quantitative trait loci for immune capacity in the pig. *J. Immunol.* **160**: 829-835
- Edfors-Lilja, I., Wattring, E., Andersson, L., Fossum, C.** (2000): Mapping quantitative trait loci for stress induced alterations in porcine leucocyte numbers and functions. *Anim. Genet.* **31**: 186-193
- Ellegren, H., Johansson, M., Chowdhary, B. P., Marklund, S., Rujter, D., Marklund, L., Brauner-Nielsen, P., Edfors-Lilja, I., Gustavsson, I., Juneja, R. K.** (1993): Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics* **16**: 431-439
- Erber, M.** (1977): Möglichkeiten des Nachweises und der Differenzierung von zwei *Sarcocystis*-Arten des Schweines. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **91**: 482-486
- Erber, M., Geisel, O.** (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der *Sarcocystis suicanis*-Infektion beim Schwein. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **92**: 197-202
- Erber, M., Meyer, J., Boch, J.** (1978): Aborte beim Schwein durch Sarkosporidien (*Sarcocystis suicanis*). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **91**: 393-395
- Falconer, D. S., Mackay, T.** (1996): Introduction to quantitative genetics. 4th edition, Longman, Harlow, UK
- Fayer, R.** (1975): Effects of Refrigeration, Cooking and Freezing on *Sarcocystis* in Beef from Retail Food Stores. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **42**: 138-140
- Fredholm, M., Winterö, A. K., Christensen, K., Kristensen, B., Nielsen, P. B., Davies, W., Archibald, A.** (1993): Characterization of 24 porcine (dA-dC)_n-(dT-dG)_n microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mamm. Genome* **4**: 187-192
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J., MacLennan, D. H.** (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**: 448-451
- Furmanski, K.** (1987): Häufigkeit von Infektionen mit *Sarcocystis miescheiriana* und *Sarcocystis suihomonis* bei Schlachtschweinen in Bezug auf verschiedene Betriebssysteme. *Vet. Med. Diss.* Tierärztliche Hochschule Hannover

- Gaillard, C.** (1997): In: Kräußlich, H.; Brem G. (Hrsg.). Tierzucht und allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziner, Ferdinand Enke Verlag: 174-186
- Gavaro, J. S., Spencer, J. L.** (1978): Breeding for genetic resistance to disease: Specific or general? *World's Poul. Sci. J.* **34**: 137-149
- Gavaro, J. S., Spencer, J. L.** (1983): Breeding for immune responsiveness and disease resistance. *Anim. Blood. Groups. Biochem. Genet.* **14**: 159-171
- Geldermann H.** (1975): Investigations on Inheritance of Quantitative Characters in Animals by Gene Markers. I. Methods, Theor. *Appl. Genet.* **46**: 319-330
- Geldermann, H., Müller, E., Moser, G., Reiner, G., Bartenschlager, H., Cepica, S., Stratil, A., Kuryl, J., Moran, C., Dovali, R., Brunsch, C.** (2003): Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F₂ families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. *J. Anim. Breed. Genet.* **120**: 363-393
- Gellin, J., Brown, S., Marshall Graves, J. A., Rothschild, M., Schook, L., Womack, J., Yerle, M.** (2000): Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. *Mamm. Genome.* **11**: 140-144
- Gestrich, R., Heydorn, A. O.** (1974): Untersuchungen zur Überlebensdauer von Sarkosporidienzysten im Fleisch von Schlachttieren. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **87**: 475-476
- Gibbons, R. A., Sellwood, R., Burrows, M., Hunter, P. A.** (1977): Inheritance of resistance to neonatal *E. coli* diarrhea in the pig: Examination of the genetic system. *Theor. Appl. Genet.* **51**: 65-70
- Giese, A., Stuhlsatz, S., Daubener, W., MacKenzie, C. R.** (2004): Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is depend on the expression of TNF-alpha receptor 2. *J. Immunol.* **173**: 3366-3374
- Godard, I., Darcy, F., Deslee, D., Dessaint, J. P., Capron, A.** (1990): Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. *Infect. Immun.* **58**: 2446-2451
- Göbel, E., Katz, M., Erber, M.** (1978): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Entwicklung von Muskelzysten von *Sarcocystis suicanis* in Hausschweinen nach experimenteller Infektion. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Org. A* **241**: 368-383
- Green, P., Falls, K., Crooks, S.** (1990): Documentation for CRIMAP Version 2.4, Washington University, School of Medicine, St. Louis, Polykopie.
- Groenen, M. A., Ruyter, D., Verstege, E. J., de Vries, M., van der Poel, J. J.** (1995): Development and mapping of ten porcine microsatellite markers. *Anim. Genet.* **26**: 115-118
- Halbur, P. G., Rothschild, M. F., Thacker, B. J., Meng, X. J., Paul, P. S., Bruna, J. D.** (1998): Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (BR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Anim. Breed. Genet.* **115**: 181-189

- Haley, C. S., Knott, S. A., Elsen, J. M.** (1994): Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* **136**: 1195-1207
- Haley, C. S., Andersson, L.**, (1997): Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. In: Genome Mapping. Dear PH, ed. Oxford, New York, Tokio: IRL Press; 49-71
- Haller, O., Frese, M., Kochs, G.** (1998): Mx Proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.* **17**: 220-230
- Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A., Soller, M., Teale, A.** (2003): Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 7443-7448
- Hasche, H. O.** (1988): Enzymaktivitäten im Blutplasma und in der Muskulatur im Verlauf der *Sarcocystis miescheiriana* Infektion der Schweine. *Vet. Med. Diss.*, Hannover
- Hepp, S.** (2006): Phänotypische und genetische Parameter ausgewählter klinischer und klinisch-chemischer Merkmale zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* im F₂-Modell beim Schwein. *Vet. Med. Diss.*, Justus-Liebig-Universität Giessen
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., Ruane, J.** (2000): Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with the focus on the situation in the nordic countries. *Livestock Prod. Sci.* **64**: 95-106
- Hernandez-Valladares, M., Naessens, J., Gibson, J. P., Musoke, A. J., Nagda, S., Rihet, P., Ole-MoiYoi, O. K., Iraqi, F. A.** (2004): Confirmation and dissection of QTL controlling resistance to malaria in mice. *Mamm. Genome* **15**: 390-398
- Heydorn, A. O., Matuschka, F. R.** (1981): Final host specificity of sarcocystis species transmitted by dogs. *Z. Parasitenkd.* **66**: 231-234
- Heydorn, A. O., Matuschka, F. R., Ipczynski, V.** (1981): Zur Schizogonie von *Sarcocystis suicanis* im Schwein. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **94**: 229-234
- Holmberg, M., Andersson-Eklund, L.** (2004): Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **87**: 2653-9
- Hospital, F., Chevalet, C., Mulsant, P.** (1992): Using Markers in Gene Introgression Breeding Programms. *Genetics* **132**: 1199-1210
- Hoyheim, B., Keiserud, A., Thomsen, P. D.** (1995): A highly polymorphic porcine dinucleotide repeat S0296 (BHT137) at chromosome 17q13. *Anim. Genet.* **26**: 58
- Hu, Z. L., Dracheva, S., Jang, W., Maglott, D., Bastiaansen, J., Rothschild, M., Reecy, J. M.** (2005): A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mamm. Genome* **15**: 792-800
- Hutt, F. B.** (1958): Genetic resistance to disease in domestic animals. *Comstock Publishing Associates*, Ithaka.

- Ivanoska, D., Cuperlovic, K., Lunney J. K.** (1999): Peripheral blood mononuclear cell subsets during *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Res. Vet. Sci.* **49**: 92-97
- Jäkel, T., Archer-Baumann, C., Boehmler, A. M., Sorger, I., Henke, M., Kliemt, D., Mackenstedt, U.** (1999): Identification of a subpopulation of merozoites of *Sarcocystis singaporensis* that invades and partially develops inside muscle cells in vitro. *Parasitology* **118**: 235-244
- Jäkel, T., Khoprasert, Y., Kliemt, D., Mackenstedt, U.** (2001): Immunglobulin subclass responses of wild brown rats to *Sarcocystis singaporensis*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 273-283
- Jansen, R. C., Napp, J. P.** (2001): Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet.* **17**: 388-391
- Janssen, R., Van Wengen, A., Verhard, E., De Boer, T., Zomerdijs, T., Ottenhoff, T. H., Van Dissel, J. T.** (2002): Divergent role for TNF-alpha in IFN-gamma-induced killing of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella typhimurium* contributes to selective susceptibility of patients with partial IFN-gamma receptor 1 deficiency. *J. Immunol.* **169**: 3900-3907
- Jeon, J., Carlborg, O., Tornsten, A., Giuffra, E., Amarger, V.** (1999): A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat. Genet.* **21**: 157-158
- Jørgensen, C. B., Cicera, S., Anderson, S. I., Archibald, A. L., Raudsepp, T., Chowdhary, B., Edfors-Lilja, I., Andersson, L., Fredholm, M.** (2003): Linkage and comparative mapping of the locus controlling susceptibility towards *E. coli* F4ab/ac diarrhea in pigs. *Cytogenet. Genome Res.* **102**: 157-162
- Kadarmideen, H., von Rohr, P., Janss, L. L. G.** (2006): From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mamm. Genome* **17**: 548-564
- Kalm, E.** (2000): Möglichkeiten und Grenzen der Marker-gestützten Selektion. 18. Hülseberger Gespräche 2000. *Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg*: 119-126
- Karlskov-Mortensen, P., Bruun, C. S., Braunschweig, M. H., Sawera, M., Markljung, E., Enfalt, A. C., Hedebo-Velander, I., Josell, A., Lindahl, G., Lundstrom, K., von Seth, G., Jørgensen, C. B., Andersson, L., Fredholm, M.** (2006): Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace I: carcass traits. *Anim. Genet.* **37**: 156-162
- Kijas, J. M., Wales, R., Tornsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L.** (1998): Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* **150**: 1177-1185
- Kim, K. S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., Rothschild, M. F.** (2000): A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. *Mamm. Genome* **11**: 131-135

Knott, S. A., Marklund, L., Haley, C. S., Andersson, K., Davies, W., Ellegren, H., Fredholm, M., Hansson, I., Hoyheim, B., Lundstrom, K., Moller, M., Andersson, L. (1998): Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* **149**:1069-80

Kosambi, D. D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**: 172-175

Kristensen, B. (1995): Possible influences of parental MHC class 1 on survival of offspring from sows naturally infected with porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Proc., Int. Vet. Immunol. Symp., Davis, California, U.S.A.*

Kuehn, Ch., Freyer, G., Weikard, R., Goldammer, T., Schwerin, M. (1999): Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of a specifically developed marker map of BTA6. *Anim. Genet.* **30**: 333-340

Kühn, J. (1865): Untersuchungen über die Trichinenkrankheit der Schweine, *Mitteilungen des Landwirtschaftlichen Institutes der Universität zu Halle*, Heft 1.2. Teil, pp. 1-84

Lacey, C., Wilkie, B. N., Kennedy, B. W., Mallard, B. A. (1989): Genetic and other effects on bacterial phagocytosis and killing by cultered peripheral blood monocytes of SLA-defined miniature pigs. *Anim. Genet.* **20**: 371-382

Lande, R., Thompson, R. (1990): Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* **124**: 743-756

Lehmann, J., Alber, G. (1998): Murine leishmaniosis: a paradigm for the importance of T helper 1 and T helper 2 cells. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **17**: 176-187

Levine, N. D. (1986): The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. *J. Parasitol.* **72**: 372-382

Li, N., Zhao, Y. F., Xiao, L., Zhang, F. J., Chen, Y. F., Dai, R. J., Zhang, J. S., Shen, S. Q., Chen Y. F., Wu, Ch. X. (1998): Candidate gene approach for identification of genetic loci controlling litter size in swine. *Proc. 6th. World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.* **26**: 403-408

Liu, H., Cheng, H. H., Tiruanagaru, V., Soffer, L., Burnside, J. (2001): A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Anim. Genet.* **32**: 351-359

Lopez-Corrales, N. L., Beattie, C. V., Rohrer, G. A. (1999): Cytogenetic assignment of 53 microsatellites from the USDA-MARC porcine genetic map. *Cyt. Cell Genet.* **84**: 140-144

Lunney, J. K., Murrel, K. D. (1988): Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine. *Vet. Parasitol.* **29**: 179-193

Maak, S. (2001): Untersuchungen zu Kandidatengenen für Leistungseigenschaften und Erbfehler beim Schwein. *Agrar Habilitationsschrift*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Madden, K. B., Moeller, R. F., Douglass, L. W., Goldman, T., Lunney, J. K.** (1993): *Trichinella spiralis*: Genetic basis and kinetics of the anti-encysted muscle larval response in miniature swine. *Exp. Parasitol.* **77**: 23-35
- Madden, K. B., Murrel, K. D., Lunney, J. K.** (1990): *Trichinella spiralis*: major histocompatibility complex-associated elimination of encysted muscle larvae in swine. *Exp. Parasitol.* **70**: 443-451
- Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Kennedy, B. W., Gibson, J., Quinton, M.** (1998): Immune responsiveness in swine: eight generations of selection for high and low immune response in Yorkshire pigs. Proceedings of 6th World Congress on Genetics Applied to livestock Production, Armidale, pp. 1-8
- Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Kennedy, B. W., Quinton, M.** (1992): Use of estimated breeding values in a selection index to breed Yorkshire pigs for high and low immune and innate resistance factors. *Anim. Biotech.* **3**: 257-280
- Marra, M. A., Hillier, L., Waterston, R. H.** (1998): Expressed sequence tags – Establishing bridges between genomes. *Elsevier Science Ltd.* pp. 4-7
- Martins, C. L., Lawman, M. J., Scholl, T., Mebus, C. A., Lunney, J. K.** (1993): African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch. Virol.* **129**: 211-225
- Matuschka, F. R.** (1987): Reptiles as intermediate and/or final hosts of Sarcosporidia. *Parasitol. Res.* **73**: 22-32
- Mayr, A.** (1991): Neue Erkenntnisse über Entwicklung, Aufbau und Funktion des Immunsystems. *Tierärztl. Praxis* **19**: 235-240
- Meeker, D. L., Rothschild M. F., Christian, L. L., Warner, C. M., Hill, H. T.** (1987): Genetic control of immune response to pseudorabies and atrophic rhinitis vaccines: I. Heterosis, general combining ability and relationship to growth and backfat. *J. Anim. Sci.* **64**: 407-413
- Meijerink, E., Fries, R., Vögeli, P., Masabanda, J., Wigger, G., Stricker, C., Neuenschwander, S., Berschinger, H. U., Stranziger, G.** (1997): Two alpha(1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor(S) and Escherichia coli F18 receptor(ECF18R) loci. *Mamm. Genome* **8**: 736-741
- Melhorn, H., Heydorn, A. O.** (1978): The Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure, *Adv. Parasitol.* **16**: 43-93
- Mengeling, W. L., Cutlip, R. C.** (1976): Pathogenicity of field isolants of hemagglutinating encephalomyelitis virus for neonatal pigs. *Am. Vet. Med. Assoc.* **168**: 236-239
- Messer, L., Wang, L., Legault, C., Rothschild, M. F.** (1996a): Mapping and investigation of candidate genes for litter size in French Large White pigs. *Anim. Genet.* **27**: 114
- Messer, L., Wang, L., Yelich, J., Pomp, D., Geisert, R. D., Rothschild, M. F.** (1996b): Linkage mapping of retinol-binding protein 4 (RBP4) gene to porcine chromosome 14. *Mamm. Genome* **7**: 396

- Meuwissen, T. H. E., van Arendonk, J. A. M.** (1992): Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J. Dairy Sci.* **75**: 1651-1659
- Miescher, F.** (1843): Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. *Bericht über die Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel* **5**: 198-202
- Müller, M., Brem, G.** (1991): Disease resistance in farm animals. *Experientia*. **47**: 923-934
- Müller, M., Brenig, B., Winnacker, E. L., Brem, G.** (1992): Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Genetics* **121**: 263-270
- Murray, M., Stear, M. J., Trail, J. C. M., D'Leteren, G. D. M., Agyemang, K., Dwinger, R. H.** (1991): Trypanosomiasis in cattle. Prospects for control. In: Axford R.F.E., Bishop, S. C., Nicholas F. W., Owen, J. B.. *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Wallingford: CABI, 203-223
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connel, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R.** (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* **235**: 1616-1622
- Nakamura, Y., Saito, M., Shibata, Y., Itagaki, H.** (1999): Induction of tumor necrosis factor α and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*. *Vet. Parasitol.* **85**: 235-243
- Nejsum, P., Roepstorff, A., Jorgensen, C. B., Fredholm, M., Thamsborg, S. M.** (2006): Breeding for parasite resistance in pigs – a future option?. In: Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. **2**: 410
- Neubert, J., Meindl, A., Theisen, A., Adams, O., Schulz, A., Feyen, O., Niehues, T.** (2005): A novel mutation in the interleukin-2 receptor gamma gene as the cause of lymphopenia in a neonate vertically exposed to human immunodeficiency virus. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 187-189
- O'Donoghue, P. J., Rommel, M.** (1992): Australien-German collaborative studies on the immunology of *Sarcocystis* infections. *Angew. Parasitol.* **33**: 102-119
- O'Donoghue, P. J., Weyreter, H.** (1982): Antigen Characterization, Antibody Classification and Immune Complex Formation in *Sarcocystis* Infections. *Zbl. Bakt. Hyg. A Abt. 1 Referate* **277**: 104-105
- O'Donoghue, P. J., Weyreter, H.** (1984): Examinations on the Serodiagnosis of *Sarcocystis* Infections II. Class-specific Immunglobulin Responses in Mice, Pigs and Sheep. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **257**: 168-184
- O'Garra, A.** (1998): Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**: 275
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, M., Hoogland, M. J., Rothschild, M. F., Meng, X. J., Halbur, P. G.** (2006): Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated disease and lesions. *Vet. Pathol.* **43**: 281-293

- Oura, C. A. L., Powell, E., Anderson, E., Parkhouse, R. M. E.** (1998): The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J. Gen. Virol.* **79**: 1439-1443
- Peelman, L. J.** (1999): Genetic investigation of the resistance mechanisms of the pig against diarrhea caused by *E. coli*. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* **61**: 489-515
- Peng, Q. L., Ren, J., Yan, X. M., Huang, X., Tang, H., Wang, Y. Z., Zhang, B., Huang, L. S.** (2007): The g.243A>G mutation in intron 17 of MUC4 is significantly associated with susceptibility/resistance to ETEC F4ab/ac infection in pigs. *Anim. Genet.* **38**: 397-400
- Pinton, P., Schibler, L., Crihiu, E., Gellin, J., Yerle, M.** (2000): Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for humans, pigs and goats. *Mamm. Genome* **11**: 306-315
- Plonait, H., Bickardt, K.** (1997): Vorwort zur zweiten Auflage. In: Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Plonait, H., Bickardt, K., (Hrsg.), Berlin: Parey
- Preston, J. M., Allonby, E. W.** (1978): The influence of breed in the susceptibility of sheep and goats to a single experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Rec.* **103**: 509-512
- Prestwood, A. K., Cahoon, R. W., Mc Daniel, T. H.** (1980): Sarcocystis Infections in Georgia swine. *Am. J. Vet. Res.* **41**: 1879-1881
- Prigione, I., Facchetti, P., Ghiotto, F., Tasso, P., Pistoia, V.** (1995): Toxoplasma gondii-specific CD4+T cell clones from healthy, latently infected humans display a Th0 profile of cytokine secretion. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1298-1305
- Przytulski, T., Porzeczkowska, D.** (1980): Studies on genetic resistance to leptospirosis in pigs. *Br. Vet. J.* **136**: 25-32
- Rasschaert, K., Verdonck, F., Goddeeris, B. M., Dutchateau, L., Cox, E.** (2007): Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection. *Vet. Microbiolog.* **123**: 249-53
- Rechav, Y., Dauth, J., Els, D. A.** (1990): Resistance of Brahman and Simmentaler cattle to Southern African ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **57**: 7-12
- Reiner, G.** (2003): Evaluierung und Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz beim Schwein – aktueller Stand und Möglichkeiten. *Tierärztl. Prax.* **31**: 151-157
- Reiner, G., Eckert, J., Peischl, T., Borchert, S., Jäkel, T., Mackenstedt, U., Joachim, A., Dauschies, A., Geldermann, H.** (2002a): Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with *Sarcocystis miescheriana*. *Vet. Parasitol.* **106**: 99-113
- Reiner, G., Melchinger, E., Kramarova, M., Pfaff, E., Buttner, M., Saalmüller, A., Geldermann, H.** (2002b): Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. *J. Gen. Virol.* **83**: 167-172

- Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Kalm, E., Gruppe, S., Kühn, Ch., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Förster, M., Brenig, B., Reents, R., Averdunk, G.** (1998): First results on somatic cell count loci from ADR bovine mapping project. *Proc. 6. WCGLAP* **26**: 426-428
- Riquet, J., Milan, D., Woloszyn, N., Schmitz, A., Pitel, F., Frelat, G., Gellin, J.** (1995): A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted chromosome 11. *Mamm. Genome* **6**: 623-628
- Roberts, D. J., Gray, A. R.** (1973): Studies on trypanosome resistant cattle. II. The effect of trypanosomiasis on N'Dama, Muturu and Zebu cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* **5**: 220-233
- Roberts, L., Baldwin, T. M., Curtis, J. M.** (1997): Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region of chromosome 17 and chromosome 9. *J. Exp. Med.* **185**: 1705-1710
- Robic, A., Dalens, M., Woloszyn, N., Milan, D., Riquet, J., Gellin, J.** (1994): Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mamm. Genome* **5**: 580-583
- Robic, A., Parrou, J. L., Yerle, M.** (1995): Pig microsatellites isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosomes. *Anim. Genet.* **26**: 1-6
- Rohrer, G. A., Alexander, J. W., Keele, J. W., Smith, T. P., Beattie, C. W.** (1994): A microsatellite linkage map on the porcine genome. *Genetics* **136**: 231-245
- Rohrer, G. A., Alexander, L., Hu, Z., Smith, T. P., Keele, J. W., Beattie, C. W.** (1996): A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* **6**: 371-391
- Rohrer, G. A., Keele, J. W.** (1998a): Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *J. Anim. Sci.* **76**: 2247-2254
- Rohrer, G. A., Keele, J. W.** (1998b): Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *J. Anim. Sci.* **76**: 2255-2262
- Rohrer, G. A., Alexander, L. J., Hu, Z., Smith, T. P., Keele, J. W., Beattie, C. W.** (1996): A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* **6**: 371-391
- Rommel, M.** (1985): Zur Pathogenese einiger durch Protozoen hervorgerufener Erkrankungen der Haustiere. *Berl. Münch. Tierärztl. Wsch.* **98**: 311-316
- Rommel, M., Heydorn, A. O., Erber, M.** (1979): Die Sarkosporidiose der Haustiere und des Menschen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wsch.* **92**: 457-464
- Rommel, M., Heydorn, A. O., Fischle, B., Gestrich, R.** (1974): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. V. Weitere Endwirte der Sarkosporidien von Rind, Schaf und Schwein und die Bedeutung des Zwischenwirtes für die Verbreitung dieser Parasitose. *Berl. Münch. Tierärztl. Wsch.* **87**: 392-396
- Rommel, M., Schwerdtfeger, A., Blewaska, S.** (1981): The *Sarcocystis muris*-Infection as a Model for Research on the Chemotherapy of Acute Sarcocystosis of Domestic Animals. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **250**: 268-276

- Rothschild, M. F., Chen, H. L., Christian L. L., Lie, W. R., Venier, L., Cooper, M., Briggs, C., Warner, C. M.** (1984b): Breed and swine lymphocyte antigen haplotype differences in agglutination titers following vaccination with *B. brochiseptica*. *J. Anim. Sci.* **59**: 643-649
- Rothschild, M. F., Hill, H. T., Christian, L. L., Warner, C. M.** (1984a): Genetic differences in serum-neutralization titers of pigs after vaccination with pseudorabies modified live-virus vaccine. *J. Vet. Res.* **45**: 1216-1218
- Rothschild, M. F., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O., Plastow, G.** (2000): Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm. Genome* **11**: 75-77
- Saalmüller, A.** (1998): Antigen-specific immune response of porcine T-lymphocytes to various pathogenes. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **17**: 71-83
- Saleque, A., Juyal, P. D., Bhatia, B. B.** (1990): Effect of temperature on the infectivity of *Sarcocystis miescheriana* cysts in pork. *Vet. Parasitol.* **36**: 343-346
- Schadt, E. E., Monks, S. A., Drake, T. A., Lusk, A. J., Che, N., Colinayo, V., Ruff, T. G., Milligan, S. B., Lamb, J. R., Cavet, G., Linsley, P. S., Mao, M., Stoughton, R. B., Friend, S. H.** (2003): Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* **422**: 297-302
- Schellander, K., Wimmers, K.** (1999): Stand und Perspektiven der Genomanalytik in der Tierzucht. *Vortrag, 51. Hochschultagung, Universität Bonn*, 23.
- Smith, T. P. L. et al.** (1995): Directed integration of the physical and genetic linkage maps of swine chromosome 7 reveals that the SLA spans the centromere. *Genome Res.* **5**: 259-271
- Schmitz A., Chaput B., Fouchet P., Guilly M. N., Frelat G., Vaiman M.** (1992): Swine chromosomal DNA quantification by bivariate flow karyotyping and karyotype interpretation. *Cytometry* **13**: 703-710
- Schnieder, T., Rommel, M.** (1983): Ausbildung und Dauer der Immunität gegen *Sarcocystis miescheriana* im Schwein bei kontinuierlicher Verabreichung kleiner Mengen von Sporozysten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **96**: 167-170
- Schnieder, T., Trautwein, G., Rommel, M.** (1984): Untersuchungen zur Persistenz der Zysten von *Sarcocystis miescheriana* in der Muskulatur des Schweines nach ein- und mehrmaliger Infektion. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **97**: 356-359
- Schwerin, M.** (2000): Struktur und Funktion von Genen beim Nutztier. 18. Hülseberger Gespräche 2000, Weimar, 21. bis 23. Juni 2000. *Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg*: 28-34
- Schwerin M., Maak S., Dorroch U., Brockmann G.** (2000): Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse im Dienste einer tiergerechten Haltung und der Verbesserung der Qualität tierischer Produkte. „Qualität von Futtermitteln und tierischen Primärprodukten“. Wissenschaftliche Vortragsagung der Institute für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik sowie Ernährungswissenschaften. Halle, Nov. 2000, Tagungsband

- Sciutto, E., Martinez; J. J., Huerta, M., Avila, R., Fragoso, G., Villalobos, N., de Aluja, A., Larralde, C.** (2003): Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and aquired resistance to infection. *Vet. Parasitol.* **116**: 223-229
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A. W., Coffman, R., Sher, A.** (1989): Role of Cytokines and CD4+ T-Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. *Immun. Rev.* **112**: 161-182
- Seaton, G., Haley, C. S., Knott, S. A., Kearsey, M., Visscher, P. M.** (2002): QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* **18**: 339-340
- Simianer, H.** (2000): Neue Zuchtstrategien dank moderner Gentechnik. *Schweinezucht und Schweinemast* **6**: 56-59
- Soller, M.** (1994): Marker-assisted selection – an overview. *Anim. Biotech.* **5**: 193-207
- Spickett, A. M., De Klerk, D., Enslin, C. B., Scholtz, M. M.** (1989): Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a bushfeld region of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **56**: 245-250
- Stear, M. J., Wakelin, D.** (1998): Genetic resistance to parasitic infection. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* **17**, 143-153
- Stranzinger, G., Went, D. F.** (1996): Molecular genetics as a diagnostic tool in farm animals. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**: 447-464
- Strohlein , D. A.** (1986): Contributions to the biology of experimental *Sarcocystis suicanis* infection in domestic swine. Athens, University of Georgia, PhD Thesis
- Sun, H. S., Wang, L., Rothschild, M. F., Tuggle, C. K.** (1998): Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15. *Anim. Genet.* **29**: 138-140
- Suzuki, Y.** (1999): Genes, celle and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* **201**: 255-271
- Tashita, H., Fukao, T., Kaneko, H., Teramoto, T., Inoue, R., Kasahara, K., Kondo, N.** (1998): Molecular basic of selective IgG2 deficiency: the mutated membrane-bound form of gamma-2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings. *J. Clin. Invest.* **101**: 677-681
- Teneberg, S., Willemsen, P., de Graaf, F. K., Karlsson, K. A.** (1990): Receptor-active glycolipids of epithelial cells of the small intestine of young and adult pigs in relation to susceptibility to infection with *Escherichia coli* K99. *FEBS Lett.* **263**: 10-14
- Tenter, A. M.** (1995): Current Research on *Sarcocystis* Species of Domestic Animals. *Int. J. Parasitol.* **25**: 1311-1330
- Tuggle, C. K., Schmitz, C. B., Gingerich-Feil, D.** (1997): Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *J. Anim. Sci.* **75**: 277-288

- Vaiman, M., Chardon, P., Rothschild, M. F.** (1998): Porcine major histocompatibility complex. In: Genetic resistance to animal diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **17**: 95-102
- Vögeli, P., Berschinger, H. U., Stamm, M., Sticker, C., Hagger, C., Fries, R., Rapacz, J., Stanzinger, G.** (1996): Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Anim. Genet.* **27**: 321-328
- Vögeli, P., Meijerink, E., Fries, R., Neuschwander, S., Vorlander, N., Stanzinger, G., Berschinger, H. U.** (1997): Ein molekularer Test für den Nachweis des E.-coli-F18-Rezeptors: Ein Durchbruch im Kampf gegen Ödemkrankheit und Absetzdurchfall beim Schwein. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **139**: 479-484
- Walker, M. S., Hughes, T. A.** (2008): Messenger RNA expression profiling using DNA microarray technology: Diagnostic tool, scientific analysis or un-interpretable data? (Review). *Int. J. Mol. Med.* **21**: 13-17
- Warnecke, H.** (1983): Histopathologische Untersuchungen über den Abbau von Sarkosporidienzysten nach Chemotherapie sowie über die Regeneration und Reparation der Muskulatur. *Vet. Med. Diss.*, Hannover
- Weber, M., Weyreter, H., O'Donoghue, P. J., Rommel, M.** (1983): Persistence of Acquired Immunity to *Sarcocystis miescheriana* Infection in Growing Pigs. *Vet. Parasitol.* **13**: 287-297
- Weller, J. I., Kashi, Y., Soller, M.** (1990): Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **73**: 2525-2537
- Weyreter, H., O'Donoghue, P. J., Weber, M., Rommel, M.** (1984): Class-specific antibody responses in pigs following immunization and challenge with sporocysts of *Sarcocystis miescheriana*. *Vet. Parasitol.* **16**: 201-205
- Wilke, P. J., Jung, M., Chen, Y., Geldermann, H.** (1994): Porcine (GT)_n sequences: structure and association with dispersed and tandem repeats. *Genomics* **21**: 63-70
- Wilkie, B. N., Mallard, B. A.** (2000): Genetic aspects of health and disease in pigs. In: Breeding for Disease resistance in farm animals, Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB, eds. Wallingford: CABI pp. 379-396
- Wilkie, B. N., Mallard, B. A., Quinton, M., Gibson, J.** (1998): Multi-trait-selection for immune response: a possible alternative strategy for enhanced livestock health and productivity. In: Wiseman, J. et al. (eds), Progress in Pig Science. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 29-38
- Wimmers, K., Murani, E., Ponsuksili, S., Yerle, M., Schellander K.** (2002): Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. *Mamm. Genome* **13**: 206-210
- Wimmers, K., Fiedler, I., Hardge, T., Murani, E., Schellander, K., Ponsuksili, S.** (2006): QTL for microstructural and biophysical muscle properties and body composition in pigs. *BMC Genetics* **7**: 15-28

Wolf, E. (2004): Nutztiere quo vadite? Neue Wege durch funktionale Genomanalyse. *DVG-Forum* **1**: 19-30

Yaguchi, H., Togawa, K., Moritani, M., Itakura, M. (2005): Identification of candidate genes in the type 2 diabetes modifier locus using expression QTL. *Genomics* **85**: 591-599

Yamashita, S., Wakazono, K., Nomoto, T., Tsujino, Y., Kuramoto, T., Ushijima, T. (2005): Expression quantitative trait loci analysis of 13 genes in the rat prostate. *Genetics* **171**: 1231-1238

Yonash, N., Bacon, L. D., Witter, R. L., Cheng, H. H. (1999): High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. *Anim. Genet.* **30**: 126-135

Yonash, N., Cheng, H. H., Hillel, J., Heller, D. E., Cahaner, A. (2001): DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. *Poult. Sci.* **80**: 22-28

Yunis, R., Heller, E. D., Hillel, J., Cahaner, A. (2002): Microsatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* in youngbroilers. *Anim. Genet.* **33**: 407-414

Zhao, Y. F., Li, N., Chen, Y., Wu, Ch. X. (1998): Preliminary research on RFLP's of the FSH beta subunit gene. *Acta Vet. Zootech. Sinica* **29**: 1959-1973

Zielasko, B., Petrich, J., Trautwein, G., Rommel, M. (1981): Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der *Sarcocystis suicanis*-Infektion. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **94**: 223-228

Zimmermann, U., Schnieder, T., Rommel, M. (1984): Untersuchungen über die Dynamik der Antikörperentwicklung bei Schweinen nach mehrfacher Immunisierung mit Sporozysten von *Sarcocystis miescheriana* und einmaliger Belastungsinfektion. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **97**: 408-411

Zinkernagel, R. M. (1998): Grundlagen der Immunologie. In: Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.: Medizinische Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart. **9**: 43-136

Ich erkläre:

Die vorgelegte Dissertation wurde von mir selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn **Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner** aussprechen. Er hat die Bearbeitung des Themas ermöglicht und stand mir jederzeit mit Rat und unermüdlichem Engagement während der Anfertigung dieser Dissertation zur Seite.

Dank an Frau **Dr. S. Hepp**, die mit der Erstellung ihrer Dissertation den Vorversuch für diese Arbeit lieferte. Ebenfalls möchte ich allen Mitarbeitern (Hr. **PD Dr. Willems**, Frau **Mülhäuser**, u.v.m.) für die hervorragende Unterstützung während der Einarbeitung im Labor danken.

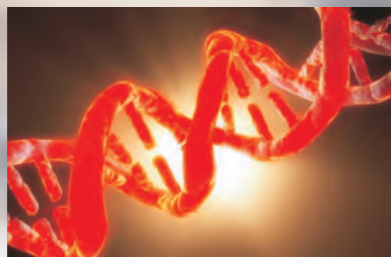
Ein großes „Danke“ an meine Freunde **Reiner Fischer** und **Florian Köhler** für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame schöne Zeit während des Studiums und im Labor.

Meiner **Familie** danke ich für die moralische Unterstützung während der Doppelbelastung durch Beruf und Promotion. Für den pekuniären Beitrag danke ich meinen **Eltern, Brigitte** und **Richard**, ganz besonders. Bei **Anika** entschuldige ich mich für die uns gestohlene gemeinsame Zeit, gleiches gilt **Tim**. Ich werde es wieder gutmachen.

Ich danke **Manfred Stieglitz** für die flexible Gestaltung meiner Arbeitszeiten als Mitarbeiter in seiner Praxis.

Anita Bauer bin ich äußerst dankbar für ihren Einsatz beim Korrekturlesen.

Der **Deutschen Forschungsgesellschaft** danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5298-6



9 783835 195298 0